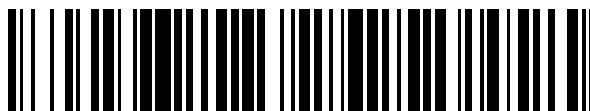


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 274**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00 (2006.01)

A61F 2/46 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04706006 .6**

96 Fecha de presentación: **28.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1592460**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DESACTIVACIÓN / ELIMINACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS DE UN TEJIDO.**

30 Prioridad:
28.01.2003 US 443243 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**Warsaw Orthopedic, Inc.
2500 Silveus Crossing
WARSAW, IN 46581, US**

72 Inventor/es:
**SHIMP, Lawrence A.;
DEAN, Sheldon y
MARTINS, Daniel**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 274 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de desactivación / eliminación de agentes patógenos de un tejido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para limpiar y desinfectar tejido animal, y para la eliminación y/o desactivación de agentes patógenos del tejido animal, tal como tejido humano, incluyendo hueso o cualquier tejido, y, más particularmente, a la limpieza y desinfección del tejido para su uso como un implante.

10 Es deseable limpiar físicamente un tejido de donante de contaminantes tales como sangre, así como eliminar o dejar inactivos los agentes patógenos potenciales (virus, bacterias, hongos, micoplasma y priones) para el uso clínico del tejido, tal como hueso, como agente de injerto, o como tejido de unión que se utilizará para reparar tendones, u otro tejido de unión. La mejor manera de conseguir esto es eliminar físicamente los contaminantes y agentes patógenos tanto como sea posible, y seguidamente atacar cualesquiera partículas patógenas, tales como virus y bacterias del hueso o del tejido de unión, con una o más soluciones de desactivación.

15 En el curso de la vida, el hueso y el tejido de unión, ya sea alogénico, autogénico o xenográfico, es normalmente estéril con respecto a las bacterias. Esto es debido a que el sistema inmune mantiene el cuerpo aséptico. Cualquier acumulación significativa de bacterias internamente es anormal y puede conducir rápidamente a la muerte (sepsis). Sin embargo, en caso de muerte, incluso por causas distintas de esta sepsis, pueden entrar bacterias en el hueso o en el tejido de unión una vez que ha cesado la vida. Los caminos habituales son la migración desde el sistema digestivo o con origen en procesos de degradación debidos al almacenamiento y la manipulación. En consecuencia, las bacterias que se encuentran en el tejido recuperado tienden a ser más en la superficie o en zonas fácilmente accesibles desde la superficie.

20 Los virus, sin embargo, se encuentran radicados más internamente. A diferencia de las bacterias, los virus pueden estar presentes en todo el cuerpo a lo largo de la vida sin causar una enfermedad fatal ni tan siquiera una afección evidente. Los virus se introducen en el tejido tal como hueso y tejido de unión a través del aporte sanguíneo y pueden estar presentes en capilares profundos del interior de cavidades internas del tejido, especialmente en los sistemas haversianos de los huesos.

25 Los procedimientos de desinfección que normalmente se emplean para limpiar y desinfectar hueso y tejido de unión antes de su trasplante, son fundamentalmente tópicos y no penetran profundamente en el hueso u otros tejidos. Así, pues, son efectivos como desinfectantes tópicos, pero no combaten bien la potencial contaminación viral interna. La esterilización es una opción, pero las técnicas de esterilización dañan, típicamente, el hueso y el tejido cuando se emplean en la dosis que se necesita para dejar los virus inactivos.

30 Puede emplearse un centrifugadora como parte de un sistema de limpieza de hueso, en la que las fuerzas centrífugas y una gravedad incrementada fuerzan los materiales y sustancias a abandonar el hueso, tanto en un estado seco como en un estado mojado o húmedo, a fin de eliminar la médula ósea y los residuos celulares. Esta acción centrífuga puede proporcionar una limpieza / desinfección efectiva para algunos contaminantes y agentes patógenos, pero los presentes inventores creen que se ocupa de los virus, especialmente de los que se encuentran en las cavidades internas del tejido, de manera eficaz.

35 Las Patentes norteamericanas Nos. 6.682.695, 6.635.222 y 6.346.216, así como las Solicitudes de Patente norteamericanas publicadas Nos. 20040013562, 20040013561, 20030213920, 20030186421, 20030185702, 20030180181, 20030182163, 20030161753, 20030124023, 20030095890, 20030064000, 20030059920, 20030059338, 20030049245, 20030031584, 20030031581, 20030012687, 20020155519 divulgan, todas ellas, métodos para esterilizar materiales biológicos en los que pueden añadirse al material protectores contra la radiación, antes del procedimiento de esterilización. Estos protectores han sido diseñados de tal manera que reducen o evitan daños en el tejido durante el tratamiento de esterilización por radiación. La presente invención constituye una solución más rápida, eficaz, directa y eficiente para introducir protectores contra la radiación, crioprotectores, sustancias mecánicamente útiles, sustancias biológicamente útiles o agentes biológicamente activos en el seno del material biológico, tal como tejido, antes de, o durante, el procedimiento de esterilización, en comparación con los métodos anteriores. El documento US 5.977.432 (A) describe un procedimiento para limpiar injertos óseos utilizando fuerza centrífuga, así como injertos óseos producidos mediante este.

45 Los presentes inventores constatan que una solución mucho mejor es utilizar un procedimiento de limpieza y desactivación de agentes patógenos que llegue a todos los espacios internos del tejido y que elimine los virus o los deje inactivos. Es posible llegar a los espacios internos del hueso mediante un procedimiento de presión / flujo que se sirve de bombas, según se ha divulgado en la Patente norteamericana poseída en común con la presente, N° 5.846.484, o mediante un procedimiento de vacío según se divulga en la Patente norteamericana poseída en común con la presente, N° 5.513.662. Es también de interés la Solicitud Internacional publicada con el N° WO/29037.

55 Sin embargo, los procedimientos patentados son de una implementación embarazosa y utilizan elementos de obturación para líquidos potencialmente poco fiables en un recipiente o vasija a presión. Estos sistemas patentados

no son deseables por estas razones.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

5 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, un procedimiento para la desactivación y/o la reducción de agentes patógenos de tejido que tiene un eje de tejido y que tiene una pluralidad de cavidades en las que residen los agentes patógenos, comprende centrifugar mediante giro o rotación en seco el tejido con una fuerza G dada que presenta una dirección dada, a fin de eliminar material del tejido y/o favorecer la penetración de disolvente en el seno del tejido, y al menos una etapa de centrifugación adicional que utiliza un fluido disolvente para dejar inactivos o reducir los agentes patógenos contenidos en el tejido. Durante la al menos una etapa de centrifugación adicional, el procedimiento incluye: orientar el eje del tejido en un ángulo no paralelo a la dirección dada de la fuerza G, siendo la fuerza G mayor que 1.000 G, para hacer penetrar de esta forma el fluido disolvente reductor de agentes patógenos en sustancialmente todas las cavidades del tejido en las que residen los agentes patógenos, a fin de dejar inactivo y/o reducir el contenido patógeno en el interior de las cavidades.

10 En un aspecto adicional, el procedimiento comprende exponer el tejido a un volumen del disolvente de al menos 3 litros durante una etapa de centrifugación.

En un aspecto adicional, el fluido disolvente se selecciona de entre al menos uno del grupo consistente en alcohol, un detergente, un oxidante, un disolvente y un agente surfactante o tensoactivo.

En un aspecto adicional, el procedimiento comprende centrifugar el tejido en al menos una parte del procedimiento, en presencia del fluido disolvente, con una fuerza G mayor que 4.000 G.

20 Según un aspecto adicional, un procedimiento para dejar inactivos y/o reducir los agentes patógenos en tejido que tiene una pluralidad de cavidades en las que residen los agentes patógenos, que comprende centrifugar el tejido con una solución de reducción de agentes patógenos en un único giro húmedo para producir una fuerza G en el material, a fin de eliminar material del tejido y favorecer la penetración de la solución en el tejido, de tal manera que la centrifugación hace penetrar la solución de reducción de agentes patógenos en sustancialmente todas las cavidades del tejido donde residen los agentes patógenos, para dejar con ello inactivos y/o reducir el contenido de los agentes patógenos en las cavidades.

De acuerdo con la presente invención, la centrifugación con la solución de reducción de agentes patógenos es continua.

30 En un aspecto adicional, el procedimiento incluye centrifugar en seco el tejido antes de centrifugar la solución de reducción de agentes patógenos, al objeto de eliminar trazas de disolventes y residuos.

Preferiblemente, el tejido comprende al menos uno de entre hueso esponjoso y cortical, y tejido de unión.

De acuerdo con un aspecto adicional, la solución disolvente de reducción comprende al menos una solución de desactivación de agentes patógenos virales y/o bacterianos para dejar inactivos los agentes patógenos.

35 En un aspecto adicional, el tejido comprende hueso, los agentes patógenos comprenden lípidos o proteínas, la solución disolvente de reducción comprende sustancias para eliminar los lípidos y/o las proteínas del hueso, el procedimiento comprende hacer fluir y centrifugar de forma continua los disolventes y/o agentes tensoactivos de reducción de agentes patógenos con el hueso, de tal manera que los disolventes y/o agentes tensoactivos se infunden de forma continua dentro y fuera de las cavidades del hueso para eliminar continuamente mediante un lavado por circulación los lípidos, proteínas y/o agentes patógenos del hueso.

40 En un aspecto adicional, el tejido es hueso, de tal manera que el eje del hueso se orienta paralelo a la dirección de la fuerza G.

En un aspecto adicional, el eje del tejido no es paralelo a la dirección de la fuerza G.

Aún otro aspecto adicional incluye la centrifugación en seco del tejido para eliminar el al menos un disolvente del tejido y para eliminar contaminantes separados, mediante la centrifugación, de las proximidades del tejido.

45 En aún otro aspecto adicional, se proporcionar un procedimiento para infundir biológica y/o mecánicamente sustancias útiles en el seno del tejido, tales como crioprotectores, protectores contra la radiación, agentes plastificantes y polímeros.

50 En un aspecto adicional, un procedimiento para la introducción de al menos unos agentes biológicos en tejido animal comprende centrifugar el tejido en presencia de un líquido que contiene el al menos un factor de crecimiento. Se incluye como el Apéndice A una lista de agentes biológicos que pueden utilizarse en la presente invención.

Definiciones:

La expresión "agentes patógenos", tal y como se utiliza en la presente memoria, consiste en cualesquiera agentes extraños o infecciosos indeseables (por ejemplo, microbios, virus, bacterias, hongos, priones, micoplasma, etc.), en particular los contaminantes de tejido que puedan impedir el uso del tejido como trasplante en el cuerpo de un animal.

La expresión "estado seco", tal y como se utiliza en la presente memoria, describe la ausencia de humedad o líquido exógeno adicional. Se considera que un tejido se encuentra en el "estado seco" si no se ha añadido humedad o líquido exógeno adicional. Por ejemplo, un tejido está en el "estado seco" cuando carece de un portador o soporte líquido, una solución disolvente de reducción u otros líquidos utilizados en la invención. La expresión "solución penetrante", tal como se utiliza aquí, significa cualquier solución, disolvente, o líquido o mezcla que sea capaz de entrar en contacto con al menos una porción del interior de un material biológico, tal como un tejido. "Solución de reducción de agentes patógenos, y solución de desactivación", tal y como se utilizan en la presente memoria, significan cualquier solución, disolvente o líquido que sea capaz de reducir el número de agentes patógenos o de dejar inactivos los agentes patógenos presentes en, o en el interior de, un material biológico. El término "protector", tal como se utiliza aquí, significa cualquier sustancia o material que impida, reduzca o elimine daños indeseables en un material biológico, o cualquier sustancia que mejore, refuerce o de otro modo incremente una propiedad del material biológico. La expresión "sustancia útil mecánicamente", tal y como se emplea en la presente memoria, quiere decir cualquier sustancia o material que impida, reduzca o elimine daños mecánicos indeseables en un material biológico, o cualquier sustancia que mejore, refuerce o aumente de otro modo una propiedad mecánica del material biológico. Una "sustancia útil biológicamente" es cualquier sustancia o material que impida, reduzca o elimine daños biológicos indeseables en un material biológico, o bien cualquier sustancia que favorezca, mejore o de otro modo aumente una propiedad biológica del material biológico. "Sustancia reactiva químicamente" es cualquier sustancia o material que reaccione con un componente del material biológico para impedir, reducir o eliminar una propiedad indeseable, o cualquier sustancia que mejore, favorezca o de otro modo incremente una propiedad deseable del material biológico por medio de una reacción química. Un "crioprotector" es cualquier sustancia o material que impida o reduzca daños indeseables en un material biológico provocados por el descenso de la temperatura de un material biológico, o bien cualquier sustancia o material que mejore, refuerce o de otro modo aumente la capacidad del material biológico para soportar temperaturas reducidas. La expresión "protector contra radiación" o "radioprotector" se refiere a cualquier sustancia o material que impida o reduzca daños indeseables en un material biológico causados por la irradiación de un material biológico, o bien cualquier sustancia o material que mejore, favorezca o de otro modo incremente la capacidad del material biológico para soportar la irradiación. La expresión "temperatura reducida", tal y como se utiliza aquí, significa cualquier temperatura por debajo de la temperatura ambiental. La expresión "temperatura incrementada, aumentada o elevada", tal y como se utiliza en la presente memoria, quiere decir cualquier temperatura por encima de la temperatura ambiental. La expresión "eje del tejido", tal y como aquí se emplea, se refiere al eje longitudinal de un tejido, que tiene una longitud que es más grande que sus otras dimensiones. Un eje longitudinal puede también estar definido por la dirección general de las fibras, tal como la dirección de las fibras de colágeno en el tejido cortical. La expresión "peso efectivo", tal y como se emplea aquí, se refiere al peso de cualquier objeto, líquido o material cuando está sometido a fuerzas G incrementadas por encima de 1 G.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un procedimiento para limpiar tejido y dejar inactivos y/o reducir los agentes patógenos del tejido, el cual tiene un eje de tejido y presenta una pluralidad de cavidades en las que residen los agentes patógenos, que comprende centrifugar mediante rotación en seco el tejido con una fuerza G dada que tiene una dirección dada, a fin de eliminar material del tejido y/o favorecer la penetración de disolvente en el tejido, y al menos una etapa de centrifugación adicional que se sirve de un fluido disolvente para dejar inactivos o reducir los agentes patógenos del tejido. El eje de tejido se refiere al eje longitudinal de un tejido que tiene una dimensión longitudinal que es mayor que sus otras dimensiones. El eje longitudinal se define por esa dimensión longitudinal.

La presurización creada por la centrifugación tiene la ventaja de evitar la necesidad de elementos de obturación de líquido embarazosos y potencialmente poco fiables en una vasija o recipiente, que se utilizan en otros métodos para mantener presurizado el líquido contenido dentro del hueso durante el proceso de tratamiento, así como de generar presiones efectivas / diferencias de presión mucho más altas que las que pueden ser generadas por bombas y elementos de obturación convencionales, o por un vacío. Esta puede también ser fácilmente aplicada a tejido de unión, que es difícil de tratar con el procedimiento de presión / flujo anteriormente descrito.

La acción centrífuga hace girar el tejido que se está tratando con el fin de crear una fuerza de gravedad artificial aumentada (G) a través del tejido. Las fuerzas G centrífugas son una función lineal del diámetro del giro o rotación y una función cuadrática de las RPM [revoluciones por minuto] del material rotado (Fuerza centrífuga relativa = $1,12 \text{ (radio en mm) (RPM/1.000)}^2$). Cuando un tejido tal como un hueso se hace rotar en una centrifugadora, este y todos sus componentes internos se vuelven sustancialmente más "pesados" de lo normal, debido al efecto de las fuerzas G aplicadas. Si la fuerza G generada es, por ejemplo, 2.000, esto significa que el peso efectivo del tejido y de los contaminantes se ve también aumentado 2.000 veces. Las fuerzas G pueden llegar a cualquier valor por encima de

1.000, por ejemplo, hasta aproximadamente 4.000 G o mayor, dependiendo del material que es centrifugado o de la velocidad de penetración deseada. Al hacer rotar en seco un hueso o un fragmento de hueso (sin que haya un fluido adicional, tal como un líquido de tratamiento, presente en torno a este), los componentes contaminantes internos “movibles” o “fluyentes” que no son de hueso o no son de tejido, tales como sangre, lípidos, líquidos, agua y virus, se hacen sustancialmente más pesados que en ausencia de las fuerzas centrífugas. Como resultado de ello, estos componentes comienzan a fluir hacia fuera del hueso en respuesta a las fuerzas centrífugas ejercidas sobre ellos. La centrifugadora puede contener cualquier tipo de rotor (por ejemplo, un rotor de ángulo fijo; un rotor de cubeta basculante o un rotor de flujo continuo. El rotor puede ser seleccionado basándose en la aplicación que se desee, tal como se describe en la presente memoria.

En circunstancias normales, un hueso, por ejemplo, puede ser sujetado verticalmente y los contaminantes denominados “movibles” no se separarán, típicamente, del hueso en respuesta a la fuerza de la gravedad. En una primera acción centrifugadora de fase de rotación en seco de acuerdo con un aspecto de la presente invención, la mayor parte de los componentes contaminantes “movibles o fluyentes situados en el seno de un tejido o sobre él fluirán hacia fuera del tejido. Este procedimiento de rotación en seco, es decir, sin que se utilicen en esta instancia otros materiales líquidos de tratamiento con fluido, elimina inicialmente la mayor parte de las partículas de virus y los fluidos (sangre) de donde se encuentran normalmente situados.

En una segunda fase de tratamiento con fluido, se requiere la desactivación por alcohol, detergente u otras soluciones, para tratar los agentes patógenos y contaminantes remanentes. Dicha desactivación requiere que la solución de desactivación para el tratamiento penetre en el tejido, por ejemplo, hueso, y entre en contacto con las partículas virales remanentes a través del tejido. Esta penetración se produce con una acción centrífuga al sumergir, al menos parcialmente, el tejido en una solución de tratamiento con líquido, y hacer rotar a continuación el líquido y el tejido en la centrifugadora. Durante el ciclo de rotación, el tejido está al menos parcialmente sumergido en el fluido de tratamiento. Debido a que las fuerzas G aumentan proporcionalmente con el radio de giro o rotación y con las RPM, se establecerá un gradiente de fuerza G a través del tejido, desde la porción situada más próxima al eje de rotación, por ejemplo, el centro del rotor de la centrifugadora, hasta la porción situada más próxima a la superficie periférica radialmente más externa del tejido. De esta forma, el fluido exhibirá un “peso efectivo” incrementado y existirá un gradiente de fuerzas G que extiende fuerzas G incrementadas en dirección radialmente hacia fuera desde el eje de giro, y se establecerá un gradiente de presiones que proporciona una fuerza de impulsión para que el fluido penetre en el hueso u otro tejido. La penetración se ve facilitada por la eliminación inicial de los contaminantes bajo el campo de fuerzas centrífugas G de la primera fase, previa, de rotación en seco.

Las soluciones utilizadas durante la centrifugación pueden tener volúmenes de aproximadamente 3 litros o más, por ejemplo, más de 6 litros.

A medida que el fluido de desactivación penetra en el tejido durante el ciclo de rotación, este desplaza el aire (contenido en las cavidades vacías), líquidos o partículas contenidos en las cavidades llenas. Los materiales desplazados que son más ligeros que el líquido de desactivación que entra en las cavidades (tales como aire y lípidos), ascienden hasta la parte superior del fluido de tratamiento, en tanto que los líquidos y objetos más pesados caerán hasta el fondo del recipiente. Los materiales contaminantes que son solubles en el fluido de desactivación para tratamiento se disolverán en el fluido. Estos serán eliminados en el procedimiento de flujo continuo.

Si el tejido tal como hueso no ha sido limpiado por completo previamente por la rotación en seco de la primera fase, la penetración y el desplazamiento aún se producirán, pero serán más lentas, y los componentes contaminantes más ligeros (tales como los lípidos) ascenderán por encima del hueso y se recogerán en una alta concentración que puede volver a contaminar el hueso al extraerlo de la centrifugadora. También, los materiales que son solubles en el fluido líquido de tratamiento permanecerán dentro de las cavidades del hueso (en un estado disuelto). La realización de una “rotación en seco” o de rotaciones en mojado adicionales después del tratamiento líquido ayudará a eliminar estos contaminantes disueltos.

El tejido se trata en un modo de procedimiento continuo en vez de el modo procedimiento por lotes anteriormente descrito. En el modo centrífugo continuo, el fluido de tratamiento se hace fluir de manera continua al interior de la centrifugadora, y el fluido de tratamiento que es continuamente extraído de la centrifugadora arrastra contaminantes y materiales de desecho. El flujo ayuda a eliminar los contaminantes más ligeros de la centrifugadora (especialmente si estos componentes son solubles o parcialmente solubles en el líquido de desactivación para tratamiento, que también sirve como agente de aclarado), en tanto que los contaminantes más pesados, en lugar de recogerse en el fondo del recipiente centrífugo (por ejemplo, cubeta, tubo o vial) como en el procedimiento por lotes, son esencialmente eliminados al 100% en el procedimiento de flujo continuo. Esto se consigue haciendo funcionar el procedimiento durante un periodo de tiempo que se mide empírica o analíticamente para cada tipo y tamaño de tejido, por ejemplo, hueso o tejido de unión, y que se demuestra que elimina los contaminantes o reduce la contaminación a cualquier nivel o grado deseado. Puede utilizarse un dispositivo de seguimiento analítico en línea o secundario con el procedimiento de flujo continuo para determinar cuándo el líquido de desactivación u otra solución queda libre de contaminantes (por ejemplo, un dispositivo instantáneo o en tiempo real, u otro dispositivo de PCR [reacción en cadena de polimerasa –“polymerase chain reaction”], cultivo de tejido, cultivo bacteriano, ensayo de placas de infección, ensayo de XTT utilizando hidrato de ácido sodio 3’-[1-[(fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazolio]-bis(4-

metoxi-6-nitro)benzenosulfónico, o el ensayo de MTT utilizando amarillo de sal [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio-bromuro] de tetrazolio, ELISA (ensayo inmunoabsorbente de enlace enzimático –“enzyme linked immunosorbent assay”), o FACS (clasificación de células automatizada por fluorescencia –“fluorescence automated cell sorting”). Opcionalmente, puede hacerse un seguimiento de materiales químicos contenidos en el líquido de desactivación o en otra solución (por ejemplo, la concentración de pH y la composición), ya sea bajo conexión o en línea, ya sea con un dispositivo de supervisión analítico secundario (por ejemplo, espectroscopia de masas por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento –“high performance liquid chromatography”), ICP-AES (espectrometría de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente –“inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry”), IPC-MS (espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente –“inductively coupled plasma-mass spectrometry”), GCMS (espectrómetro de masas por cromatografía de gas), y MS por MALDI-TOF (espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción / ionización por láser asistida matricialmente –“matrix-assisted laser desorption / ionization-time of flight mass spectrometry”), y absorción atómica.

Si bien ambos modos por lotes (un procedimiento de flujo estático) y de flujo continuo son efectivos, el modo de flujo continuo reduce la posibilidad de contaminación de retorno desde los materiales retirados y facilita cambios de fluido automatizados sin tener que detener y vaciar los tubos, botellas o cubetas de centrifugado. Puede llevarse a cabo un procedimiento combinado continuo y en lotes utilizando diferentes centrifugadoras para cada tipo de etapa, o bien utilizando una centrifugadora de flujo continuo con disposiciones para detener el flujo de fluido a voluntad. El flujo de fluido ha de ser detenido en lugares tanto a la entrada como a la salida. En esta situación, la centrifugadora de flujo continuo funciona como una centrifugadora por lotes, lo que es deseable para conservar el fluido durante la etapa de penetración, o cuando se lleva a cabo un tratamiento enzimático, una digestión enzimática, otro lapso de incubación o un tratamiento protector, o se lleva a cabo un tratamiento de plastificación. Una vez completada la etapa de “lote”, puede reanudarse el flujo de fluido de un modo continuo, y los residuos se eliminan mediante lavado por circulación.

Cuando se desea una permeabilidad completa a la penetración del hueso, existen fuerzas G mínimas para obtener la permeabilidad completa a la penetración en un tiempo razonable, por ejemplo, más de 1.000 G. Se dan también condiciones mínimas de rotación en seco hasta aproximadamente 1.000 G.

El tejido tal como hueso, que puede tener un eje longitudinal según se define por la dirección de las fibras, tal como el hueso cortical, puede disponerse orientado de un modo regular o aleatorio dentro de una centrifugadora, es decir, con el eje del hueso paralelo o no paralelo a la dirección de la fuerza centrífuga G. La orientación se aplica más específicamente al hueso cortical (denso). El hueso esponjoso (poroso) es, generalmente, anisótropo y, por tanto, la dirección importa poco. El hueso cortical, sin embargo, presenta una estructura fibrosa más direccional, con fibras de colágeno mineralizadas que discurren generalmente paralelas al canal medular. Existe también un sistema de circulación sanguínea interno en el hueso cortical que discurre vertical y horizontalmente con respecto a la dirección del canal medular dentro de un hueso largo como el fémur o la tibia, por ejemplo, en tanto que en el hueso esponjoso tiene tan solo un sistema de circulación externo (que discurre a través de los macroporos de la estructura esponjosa). En algunas realizaciones, puede ser preferible orientar el hueso para maximizar o mejorar la eficacia de la penetración de soluciones en el tejido. Esto puede determinarse llevando a cabo una centrifugación de ensayo de permeabilidad a la penetración utilizando un detergente o alcohol que contenga un pigmento. Después de llevar a cabo una rotación con los parámetros experimentales, solución de pigmento y orientación del tejido, el tejido puede ser examinado por lo que respecta a la penetración del pigmento mediante un análisis histológico de corte transversal.

El objeto es eliminar los contaminantes y elementos de médula (sangre y lípidos) del hueso esponjoso macroporoso, así como el contenido de los canales internos (canales haversianos) del hueso cortical (por ejemplo, agentes patógenos, sangre y lípidos).

Las fuerzas centrífugas G de la magnitud deseada producen como resultado flujos de la solución o soluciones de limpieza y desinfección al interior de todos los espacios internos del hueso, independientemente de la orientación del hueso.

Los incrementos de la fuerza G redujeron el tiempo necesario para la penetración de las soluciones en el hueso. Sin embargo, existe también un límite superior práctico para la fuerza centrífuga G que viene dado por el umbral de los daños en el hueso. Cuando no son deseables o aceptables daños en el hueso, puede llevarse a cabo un ensayo de centrifugación con la fuerza G, tiempo y soluciones del procedimiento de limpieza. Tras la centrifugación, el tejido puede ser examinado histológica y mecánicamente para determinar si se ha producido un daño inaceptable durante el procedimiento. En el caso de que los daños en el tejido no sean algo que preocupe, la fuerza G y el tiempo pueden ser incrementados hasta cualquier fuerza y tiempo deseados con el fin de conseguir la penetración y desactivación deseadas. El hueso cortical es más fuerte que el hueso esponjoso, y el hueso cortical es más resistente a la compresión. Cargas de compresión máximas sostenibles típicas para el hueso cortical son de 60 a 100 MPa, lo que corresponde a una fuerza G de aproximadamente 31.000 G (suponiendo una densidad ósea promedio de 2 g/cc, y que el canal medular es perpendicular al eje de rotación). En otras condiciones de carga, los cálculos no son tan inmediatos. Por ejemplo, en un rotor de ángulo fijo o centrifugadora cargada aleatoriamente, las fuerzas que actúan en el hueso no serán de compresión pura. Pueden existir cargas de flexión aplicadas a las piezas de hueso más largas que no están uniformemente soportadas a lo largo de su longitud, o bien contactos

puntuales en los que una superficie acusadamente curvada del hueso se apoye contra una superficie plana o de gran radio de curvatura de la centrifugadora. En estos casos en los que no son aceptables ni deseables los daños, puede llevarse a cabo una experimentación para determinar el umbral de daño al hueso, al objeto de establecer un intervalo de fuerzas G seguras. Para el hueso esponjoso, la resistencia mínima a la compresión es de aproximadamente 3 MPa. Esto corresponde a una fuerza G de aproximadamente 3.250 G, suponiendo que el hueso es de una sola pieza (o un apilamiento de piezas) de aproximadamente 100 mm de altura.

En el caso de que no sean deseables daños al hueso o resulten inaceptables, la fuerza máxima que puede aplicarse al hueso esponjoso es mucho menor que la fuerza que puede aplicarse al hueso cortical, incluso si el hueso cortical no se ha cargado de forma óptima. Los poros y cavidades del hueso cortical son también mucho más duros de penetrar que el hueso esponjoso, de manera que los ciclos de tratamiento óptimos para el hueso cortical y para el hueso poroso serán diferentes. Sigue siendo posible, sin embargo, tratar los dos tipos de hueso juntos siempre y cuando las condiciones escogidas sean satisfactorias para el hueso más débil presente. De nuevo, si los daños al tejido no son algo que preocupe, puede ser utilizada cualquier fuerza G o tiempo. Se utilizan estudios empíricos para optimizar el procedimiento centrífugo para el tipo de tejido que se está tratando con respecto a los daños, al tiempo de tratamiento y a la eficacia del tratamiento. Dichos estudios se encuentran dentro de los conocimientos de las personas con conocimientos ordinarios de esta técnica; por ejemplo, puede utilizarse una solución que comprende un pigmento en el procedimiento de centrifugación. Tras la centrifugación del tejido tal como el hueso, puede examinarse su sección transversal histológica. Pueden también llevarse a efecto ensayos mecánicos tales como extensiométricos, de fluencia y de resistencia mecánica. Ejemplos de maneras positivas para minimizar los daños por la carga consisten en proporcionar una serie de particiones o divisiones, estantes, soportes de estante, esponjas, cajas protectoras u otros soportes de tejido adecuados dentro de la vasija de centrifugación, a fin de impedir que se formen grandes apilamientos de hueso, tejido u otro material biológico. En una realización, el hueso esponjoso, más débil, puede ser apilado encima de piezas corticales más fuertes, y se limita la máxima fuerza G del procedimiento. En algunas realizaciones, soportes de tejido adecuados garantizan que los contaminantes se mantengan lejos del tejido, al tiempo que se permite que disolventes y soluciones fluyan libremente. En otras realizaciones, puede ser deseable utilizar soportes de tejido con membranas o barreras selectivamente permeables que permiten fluir a su través a las partículas de ciertos tamaños, o restringir las direcciones del desplazamiento de las partículas o del líquido a un único sentido. Tales barreras incluyen filtros y membranas de diálisis, aunque no están limitadas por estos.

La ventaja principal de utilizar una fuerza centrífuga en el tratamiento de los huesos es la penetración incrementada de fluidos de desactivación / limpieza y desinfección / protección / plastificación. Adicionalmente, el uso de la centrifugadora es un método más "rápido", más eficiente, minucioso y más efectivo para conseguir la penetración, en comparación con otros métodos. La centrifugadora puede ser utilizada por sí sola para una etapa de penetración, o para llevar a cabo un procedimiento completo de tratamiento. Las etapas de tratamiento son, preferiblemente, una rotación en seco para eliminar contaminantes sueltos / sangre / lípidos, un tratamiento de penetración secuencial o combinado con una o más soluciones de desactivación tales como un detergente o un alcohol (lo que puede realizarse por rotación o u otro método, por ejemplo, sonicación, agitación), y una rotación en seco para eliminar residuos de la solución de desactivación. Opcionalmente, puede añadirse al procedimiento un tratamiento enzimático utilizando una enzima tal como una lipasa o una proteasa para eliminar o modificar todos los lípidos o proteínas, o algunos seleccionados, a fin de ayudar a la limpieza y desinfección, la preparación y el tratamiento del tejido. Puede añadirse, opcionalmente, un agente protector tal como el glicerol, o un antioxidante al procedimiento con el fin de tratar el tejido. Los agentes protectores pueden ser introducidos por centrifugación continua, sonicación, incubación o por vacío / flujo de presión.

Pueden añadirse etapas adicionales tales como una etapa profunda de limpieza y desinfección utilizando un disolvente o detergente, preferiblemente en una centrifugadora de flujo continuo, así como una etapa de penetración utilizando cualquier tipo de solución de desactivación tal como un peróxido o un ácido, o bien crioprotectores, o sustancias biológicamente útiles.

En algunas realizaciones, es posible llevar a cabo algunas etapas parcialmente en la centrifugadora y parcialmente fuera de la centrifugadora. Por ejemplo, puede infundirse una solución de penetración en el hueso utilizando una centrifugadora y, a continuación, puede extraerse el hueso de la centrifugadora y dejarse asentar mientras la solución actúa en los virus / bacterias / lípidos o proteínas existentes en el hueso. Alternativamente, el hueso, tejido u otro material biológico puede ser incubado a cualquier temperatura, presión o pH que sea deseable para la reacción dada. Dicha temperatura puede ser 37° o la temperatura ambiental, y dicha presión atmosférica puede ser 1 atmósfera para cierta reacción enzimática. Para otras reacciones, el pH, la temperatura y la presión pueden ser más elevados o inferiores. Alternativamente, la centrifugadora puede utilizarse únicamente para la eliminación de contaminantes en un ciclo de rotación en seco.

En una alternativa, puede implementarse un procedimiento para eliminar lípidos y/o proteínas del hueso mediante la centrifugación del hueso en presencia de una o más enzimas (por ejemplo, lipasas y proteasas) que digieren los lípidos y/o las proteínas para hacerlos más solubles. El hueso es al menos parcialmente sumergido en un fluido que contiene las enzimas. Tales enzimas son bien conocidas por las personas con conocimientos ordinarios de esta técnica (por ejemplo, tripsina, papaína, furina, pepsina, etc.). La acción de centrifugación crea fuerzas G suficientes

para forzar o infundir las enzimas al interior de sustancialmente todas las cavidades del hueso. Las enzimas se utilizan para digerir los lípidos y/o proteínas que revisten los agentes patógenos, a fin de hacerlos más solubles. Adicionalmente, la temperatura, el pH y la presión pueden ser modificados para controlar la velocidad de las reacciones enzimáticas o químicas. Una vez completado el procedimiento de digestión, lo que puede determinarse empírica o analíticamente para especímenes de hueso individuales, los residuos son eliminados por los procedimientos de flujo continuo anteriormente descritos.

Como resultado de ello, se divulga un procedimiento práctico y eficiente para limpiar y desactivar / eliminar agentes patógenos del hueso o de otro tejido destinado al trasplante, al tiempo que se le infunden sustancias útiles. En comparación con solo un procedimiento de presión / flujo del tipo de aclarado, el procedimiento centrífugo proporciona gradientes de presión incrementados a la vez que minimiza el uso de fluido y las complicaciones hidráulicas. Comparada con un procedimiento del tipo de baño de ultrasonidos, la centrifugación proporciona una mayor penetración en un periodo de tiempo más corto.

Pueden añadirse sustancias útiles mecánicamente para mejorar el procedimiento. Tales sustancias mecánicamente útiles incluyen polímeros que pueden ser endurecidos por calor, reacción química, eliminación, extracción o evaporación de disolventes, a fin de añadirse a la resistencia del tejido o mejorar de otro modo las propiedades mecánicas del tejido. Las sustancias mecánicamente útiles pueden ser añadidas por medio de la infusión de polímeros y materiales similares en el interior del tejido durante la operación de centrifugación o las etapas de incubación, y la eliminación, extracción o evaporación de disolvente puede producirse durante la operación de centrifugación o en algún otro momento anterior o posterior a la centrifugación. Por otra parte, pueden infundirse también en el seno del tejido sustancias reactivas químicamente. Las sustancias químicamente reactivas, tales como agentes oxidantes, rompen o descomponen los lípidos y/o las proteínas presentes en las cavidades del tejido. Dichos agentes químicamente activos incluyen aniones oxo derivados de peróxidos, radicales libres y sustancias similares.

Otras sustancias de utilidad que pueden ser infundidas en virtud de la presente invención son los agentes biológicos según se incluyen en el Apéndice A, los crioprotectores tales como el glicerol y el manitol, que inhiben la formación de cristales, el sulfóxido de dimetilo, el propileno glicol, el dióxido de carbono líquido, las glicoproteínas de sangre de pez aisladas de especies del género *Trematomus* o *Borchbrenkinki arachis*, la formamida, la polivinil pirrolidona, la trehalosa, el almidón de hidroxietilo, agentes plastificantes tales como la carboxil metil celulosa, otros compuestos polihidroxídicos, por ejemplo, 1,4-butileno glicol, dietileno glicol, trietileno glicol, tetraetileno glicol, dipropileno glicol; copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, por ejemplo, del tipo conocido y comercialmente disponible bajo los nombres comerciales Pluronic y Emkalyx; copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, por ejemplo, del tipo conocido y comercialmente disponible bajo el nombre comercial Poloxamer; alquilfenolhidroxipolioxietileno, por ejemplo, del tipo conocido y comercialmente disponible bajo el nombre comercial Triton, y sustancias similares. Y el polihidroxi éster, por ejemplo, monoacetina, triacetina, poli(oxialquilen) glicol éster, y sustancias similares. Otras sustancias de utilidad que pueden ser infundidas son alcoholes grasos, por ejemplo, alcoholes primarios, usualmente de cadena rectilínea y que tienen de 6 a 13 átomos de carbono, incluyendo el alcohol caproico, el alcohol caprílico, el alcohol de undecilo, el alcohol de laurilo y el tridecanol. Otras sustancias de utilidad que pueden utilizarse en la invención son los ésteres de alcoholes grasos, por ejemplo, el etil hexil palmiato, el isodecil neopentato, el octadodecil benzoato, el dietil hexil maleato y similares. Adicionalmente, es posible utilizar ácidos grasos que tienen de 6 a 11 átomos de carbono, por ejemplo, el ácido hexanoico, el ácido heptanoico, el ácido octanoico, el ácido decanoico y el ácido undecanoico. También ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, ésteres de ácido graso de polioxietileno-sorbitano; por ejemplo, los ésteres de mono- y tri-laurilo, palmitilo, estearilo, y oleilo; por ejemplo, del tipo disponible bajo el nombre comercial Tween, en la Imperial Chemical Industries; ésteres de ácido graso de polioxietileno; por ejemplo, ésteres de ácido esteárico de polioxietileno del tipo conocido y comercialmente disponible bajo el nombre comercial Myrj; ésteres de ácido mono- y di-graso de propileno glicol, tales como el dicaprilato de propileno glicol; el dilaurato de propileno glicol, el hidroxiestearato de propileno glicol, el isoestearato de propileno glicol, el laureato de propileno glicol, el ricinoleato de propileno glicol, el estearato de propileno glicol y el diéster de ácido caprílico-cáprico de propileno glicol, disponible bajo el nombre comercial Miglyol; mono-, di-, y mono/di-glicéridos, tales como los productos de esterificación del ácido caprílico o caproico con glicerol; por ejemplo, del tipo conocido y comercialmente disponible bajo la marca comercial imwitor, ésteres de ácido graso sorbitano, por ejemplo, del tipo conocido y comercialmente disponible bajo el nombre comercial Span, incluyendo sorbitanmonolauril, -monopalmitil, -monoestearil, -triestearil, monooleil y trioleil ésteres, monoglicéridos, por ejemplo, monooleato de glicerol, monopalmitato de glicerol, y monoestearato de glicerol, por ejemplo, según se conocen y están comercialmente disponibles bajo los nombres comerciales Myvatex, Myvaplex y Myverol, y monoglicéridos acetilados, por ejemplo, mono- y di- acetilados, por ejemplo, según se conocen y están comercialmente disponibles bajo el nombre comercial Myvacet; pueden también utilizarse con la invención tallowato de isobutilo, n-butilestearato, n-butil oleato y n-propil oleato. Es posible también introducir en el tejido, utilizando la presente invención, silicona líquida, por ejemplo, siloxanos de polialquilo, tales como el polimetil siloxano, el poli(dimetil siloxano) y el polialquilaril siloxano. Agentes polihidroxídicos de utilidad poseen de 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono e incluyen clases de compuestos tales como alcoholes polihídricos acíclicos, azúcares no reductores, alcoholes dulces, ácidos dulces, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos solubles en agua o dispersables en agua, polisacáridos y derivados conocidos de los anteriores. Compuestos polihidroxídicos específicos incluyen el etileno glicol, dietileno glicol, trietileno glicol, 1,2-propanodiol, trimetiletano, trimetilopropano, eritritol, pentaeritritol, glicoles de polialquilen

- tales como los glicoles de polietileno, xilitol, sorbitol, manitol, dulcitol, arabinosa, xilosa, ribosa, adonitol, arabitol, ramosa, inositol, fructosa, galactosa, glucosa, manosa, sorbosa, sucrosa, maltosa, lactosa, maltitol, lactitol, estaquiosa, maltopentaosa, ciclomaltohexaosa, carragenano, ágar, ácido algínico, goma guar, goma de tragacanto, goma de la haba de langosta, goma arábica, goma de xantano, amilosa, mezclas de cualquiera de los anteriores, y sustancias similares. Adicionalmente, pueden utilizarse sustancias que protegen de los daños de las radiaciones si el hueso o el tejido han de ser irradiados en una etapa subsiguiente.
- Se ha descrito, por lo tanto, un procedimiento para desactivar patógenos presentes en tejido que tiene una pluralidad de cavidades en las que residen agentes patógenos, mediante la centrifugación de al menos una solución de reducción de agentes patógenos, al interior de sustancialmente todas las cavidades del tejido en las que residen los agentes patógenos, a fin de reducir con ello el contenido de agentes patógenos en las cavidades.
- También se muestra un procedimiento para desactivar y/o reducir los agentes patógenos del tejido que tiene un eje de tejido y que presenta una pluralidad de cavidades en las que residen los agentes patógenos, el cual comprende centrifugar por rotación en seco el tejido con una fuerza G dada que tiene una dirección dada, al objeto de eliminar material del tejido y/o favorecer la penetración de disolvente en el tejido, y al menos una etapa de centrifugación adicional que utiliza un disolvente fluido para desactivar o reducir los agentes patógenos del tejido. Durante la al menos una etapa de centrifugación adicional, se incluye la etapa de orientar el eje del tejido en un ángulo no paralelo a la dirección dada de la fuerza G, siendo la fuerza G mayor que 1.000 G, a fin de hacer penetrar, con ello, el fluido disolvente de reducción de agentes patógenos en sustancialmente todas las cavidades del tejido en las que residen los agentes patógenos, con el fin de desactivar y/o reducir el contenido de agentes patógenos en las cavidades.
- El procedimiento descrito también incluye hacer rotar el tejido en al menos una parte del procedimiento, en presencia de un fluido de limpieza y desinfección del tejido, con una fuerza G mayor que 1.000 G y, preferiblemente, del orden de 4.000 G o mayor.
- Se ha mostrado también, por tanto, un procedimiento en el que, durante la centrifugación, el tejido se expone, preferiblemente, a un volumen de al menos una solución de limpieza y desinfección de al menos 3 litros y que puede ser de aproximadamente 4 o 5 litros, por ejemplo.
- Se ha mostrado también un procedimiento para centrifugar en seco el tejido tras la centrifugación de la al menos una solución para eliminar trazas de disolventes y de residuos, tal como la centrifugación en seco del tejido antes de centrifugar la al menos una solución con el fin de eliminar al menos uno de entre sangre, lípidos y proteínas, o todos ellos.
- Por otra parte, se ha mostrado al menos una solución que comprende al menos una solución de desactivación de agentes patógenos virales y/o bacterianos, destinada a dejar inactivos los agentes patógenos tales como bacterias o virus que puedan residir en las cavidades del tejido tal como hueso o tejido de unión.
- Se ha mostrado también un procedimiento en el que la centrifugación para hacer fluir la al menos una solución lava por circulación los agentes patógenos de las cavidades y deja inactivos los agentes patógenos dentro de las cavidades, y, a continuación, la al menos una solución que porta los agentes patógenos arrastrados por circulación, desde las proximidades del tejido. Por otra parte, de acuerdo con la invención, los disolventes y/o agentes surfactantes o tensoactivos, son continuamente infundidos dentro y fuera de las cavidades del hueso con el fin de lavar por circulación de forma continua los lípidos y/o proteínas del hueso.
- Se describe también un procedimiento para limpiar tejido animal que tiene cavidades y que incluye material contaminante que interfiere o se interpone con la penetración de cavidades del tejido por parte de un fluido, de tal manera que el tejido define un eje longitudinal, comprendiendo el procedimiento centrifugar el tejido en una centrifugadora por lotes, primero en un estado seco, a fin de eliminar el material contaminante para favorecer la penetración de fluidos en las cavidades del tejido, al que siguen al menos dos etapas de centrifugación, cada una de las cuales produce una fuerza G en una dirección dada en el tejido, y que utilizan al menos un disolvente para producir, con ello, la desactivación y/o la eliminación de contaminantes bacterianos y/o virales presentes en el tejido, de tal manera que el eje del tejido se orienta según una orientación dada con respecto a la dirección dada de la fuerza G, y de modo que la fuerza G de cada etapa es al menos 1.000 G.
- Un procedimiento adicional puede incluir infundir sustancias útiles biológica y/o mecánicamente en el seno del tejido utilizando el procedimiento anteriormente descrito.
- Por ejemplo, las sustancias útiles biológicamente incluyen al menos un antibiótico o un preservador o conservante de tejido durante el almacenamiento del tejido, o al menos un factor de crecimiento de tejido destinado a liberarse desde el tejido tras la implantación del tejido en un animal.
- Las sustancias mecánicamente útiles incluyen agentes plastificantes que ayudan al tejido a conservarse flexible o plegable tras el secado de congelación o el secado, tales como el glicerol, la carboxil metil celulosa, o materiales que protegen de los efectos dañinos de la radiación. Asimismo, las sustancias mecánicamente útiles pueden incluir

materiales reforzadores estructurales que se endurecen térmica o químicamente, tales como polímeros y sustancias similares. Así, pues, pueden añadirse crioprotectores, protectores contra la radiación, agentes plastificantes o polímeros líquidos a las cavidades del tejido con el fin de mejorar el tejido.

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1

10 Se colocaron cortes o secciones transversales de hueso cortical que se cortaron de un fémur y una tibia humanos, con un espesor de aproximadamente 20 mm, en una centrifugadora de cubeta basculante, orientadas de tal manera que los canales medulares de las piezas de hueso se orientaban a lo largo del eje de la cubeta (formando así un ángulo de 90 grados con respecto al eje de rotación). El hueso se colocó en un soporte de estante (hecho de una pantalla) situado dentro de la cubeta de la centrifugadora, de tal manera que el material separado o soluble pudiera caer lejos del hueso. El hueso se hizo rotar en seco durante 10 minutos a 7.500 RPM, y a continuación se hizo rotar con alcohol pigmentado durante 10 minutos a 7.500 RPM. La penetración del pigmento en los espacios internos de las secciones del hueso fue mayor que el 99%, según se midió por análisis de corte transversal histológico.

Ejemplo 2

15 Se colocaron secciones de hueso cortical cortadas de un fémur y una tibia humanos, con un espesor de aproximadamente 20 mm, en una centrifugadora de cubeta basculante, orientadas de tal manera que los canales medulares de las piezas de hueso se orientaban perpendicularmente al eje de la cubeta (formando así un ángulo paralelo al eje de rotación). El hueso se colocó en un soporte de estante (hecho de una pantalla) situado dentro de la cubeta de la centrifugadora, de tal modo que el material separado pudiera caer lejos del hueso. El hueso se hizo rotar en seco durante 60 minutos a 7.500 RPM, y a continuación se hizo rotar con alcohol pigmentado durante 60 minutos a 7.500 RPM. La penetración del pigmento fue mayor que el 99%, según se midió por análisis de corte transversal histológico.

Ejemplo 3

25 Se cortaron secciones de hueso cortical de un fémur y una tibia humanos, con un espesor de aproximadamente 20 mm, y se colocaron en una centrifugadora con un rotor que tenía un ángulo fijo de 22 grados. Las piezas de hueso se colocaron con sus canales medulares orientados paralelamente al eje de la cubeta (formando, de este modo, un ángulo de 22 grados con respecto al eje de rotación). El hueso se colocó sobre un soporte de estante (hecho de una pantalla) situado dentro de la cubeta de la centrifugadora, de tal manera que el material separado caía lejos del hueso durante la centrifugación. El hueso se hizo rotar en seco durante 10 minutos a 7.500 RPM, y a continuación se hizo rotar con alcohol pigmentado durante 10 minutos a 7.500 RPM. La penetración del pigmento fue del 100%, según se midió por análisis de corte transversal histológico.

Ejemplo 4

35 Se repitió dos veces el experimento del Ejemplo 1, solo que esta vez se utilizó en lugar de alcohol una solución pigmentada a 250 ppm [partes por millón] de agente tensoactivo no iónico Triton-X 100 en agua. Ambas experiencias dieron como resultado un 99% o más de penetración del pigmento, según se midió por análisis de corte transversal histológico.

Ejemplo 5

40 Se repitió el experimento del Ejemplo 2, solo que esta vez se utilizó, en lugar de alcohol, una solución pigmentada a 250 ppm de agente tensoactivo no iónico de la marca Triton-X 100 en agua. La penetración del pigmento era mayor que el 99%, según fue medida por análisis de corte transversal histológico.

Ejemplo 6

Se repitió el experimento del Ejemplo 3, solo que esta vez se utilizó, en lugar de alcohol, una solución pigmentada a 250 ppm de agente tensoactivo no iónico de la marca Triton-X 100 en agua. La penetración de la solución de pigmento fue del 98,6%, según se midió por análisis de corte transversal histológico.

45 Ejemplo 7

Se repitió el experimento del ejemplo 4 a una velocidad y una fuerza G menores (870 G, 2.500 RPM). Tras la rotación en seco durante 1 hora, y haciéndose rotar con la solución de la marca Triton-X 100 durante 5 minutos, se midió la penetración. Se apreció únicamente una penetración del pigmento del 64%, que se midió por análisis de corte transversal histológico.

50 Se determinó la relación de tiempo / RPM para obtener la limpieza durante el ciclo de "rotación en seco", mediante experimentos con hueso cortical. El hueso cortical se escogió sobre el hueso esponjoso porque el hueso corticales más denso y más difícil de penetrar, y, de esta forma, representa el "peor de los casos". El procedimiento de rotación

eliminó los fluidos con base de agua tales como la sangre y fluidos del tejido, así como algunos lípidos, según se midió por la pérdida de peso y el análisis de extracción Soxlet de lípidos de muestras de hueso que se tomaron antes y después de la centrifugación.

Ejemplo 8

5 Se pesó hueso como el utilizado en el experimento 1, se colocó en una centrifugadora de cubeta basculante, y se hizo rotar en seco durante tiempos variables y a RPM variables. El hueso llegó a un contenido de humedad fijo de aproximadamente el 9 por ciento, según se midió por titulación o valoración de Carl Fischer, sin importar qué fuerza G se utilizara, siempre que estuviera comprendida en el intervalo de 400 G a 4.000 G. Los tiempos necesarios para alcanzar este peso variaban de 10 minutos para la fuerza G más pequeña a menos de 5 minutos para la fuerza G más grande.

Ejemplo 9

15 Se sumergieron anillos de hueso cortical, cortados de anillos de tibia y de fémur, en una solución de agente tensoactivo de la marca Triton-X 100 a 250 ppm y un baño de pigmento, dentro de un aparato limpiador por ultrasonidos. El aparato limpiador se hizo funcionar a una frecuencia de aproximadamente 40 kHz durante una hora. La penetración del pigmento oscilaba entre el 3% y el 49%. Esta era muy inferior a la penetración de más del 99% con la solución de pigmento y sustancia de la marca Triton-X 100, después de 10 minutos en la centrifugadora, del Ejemplo 4.

Ejemplo 10

20 Se colocaron bloques de hueso esponjoso pesados en una centrifugadora de cubeta basculante, y se hicieron rotar en seco durante intervalos de tiempo variables a 5.000 RPM. Se midió el contenido de lípidos del hueso sometido a rotación y se comparó con el de muestras de control, no tratadas, según se midieron mediante el análisis Soxlet de lípidos de muestras de hueso tomadas antes y después de la centrifugación. Los controles contenían el 24% en peso de lípidos. Estos descendieron hasta aproximadamente el 3% a los 10 minutos y hasta aproximadamente el 2% en peso a los 30 minutos, según se midieron por extracción Soxlet de lípidos de muestras de hueso tomadas antes y después de la centrifugación.

Ejemplo 11

30 Se tratan materiales biológicos tales como tejidos de unión y hueso utilizando la invención que se ha descrito en la presente memoria para dejar inactivos o eliminar más rápidamente agentes patógenos, introducir protectores contra la radiación, crioprotectores, sustancias mecánicamente útiles, sustancias biológicamente útiles o agentes biológicamente activos, en el material biológico tal como tejido, antes del procedimiento de esterilización o durante este, en comparación con los métodos previos.

35 Por ejemplo, se coloca en una centrifugadora una pieza de hueso o un hueso completo según se indica en la columna 1 de la tabla que sigue, con una longitud conforme a lo indicado en la columna 2. El hueso o pieza de hueso se coloca en un soporte de estante (hecho de una pantalla) o en un papel de filtro, dentro de la cubeta de la centrifugadora, de tal manera que el material separado o soluble puede caer fuera del hueso. El hueso se hace rotar en seco con uno cualquiera de los parámetros según se indican en la columna 3 y uno cualquiera de los parámetros indicados en la columna 4 de la tabla dada a continuación, y seguidamente se hace rotar con la solución pigmentada, disolvente u otro líquido que se desee, de nuevo con uno cualquiera de los parámetros según se indican en la columna 3 y uno cualquiera de los parámetros indicados en la columna 4 de la tabla que sigue. La penetración de la solución de pigmento, disolvente u otro líquido en los espacios internos del hueso o de los fragmentos de hueso es al menos uno cualquiera de los valores indicados en la columna 5 de la tabla que sigue. En todos los casos, la penetración se mide por análisis histológico.

1. Hueso o fragmento tratado	2. Longitud del hueso (centímetros)	3. Fuerza G utilizada para el hueso completo o los fragmentos de hueso	4. Tiempo de centrifugación utilizado para el hueso completo o los fragmentos de hueso	5. Penetración mínima de solución en el hueso o en los fragmentos
Fémur	42-46	Aproximadamente 500 G	1 minuto	Al menos el 25%
Tibia	37-41	Aproximadamente 1.000 G	5 minutos	Al menos el 35%
Húmero	30-34	Al menos 1.500 G	10 minutos	Al menos el 45%
Radio	23-24	Al menos 3.000 G	15 minutos	Al menos el 75%

Ulna o cúbito	24-26	Al menos 5.00 G	30 minutos	Al menos el 75%
Fíbula	34-41	Al menos 7.500 G	1 hora	Al menos el 90%
Cualquier fragmento de hueso	De 0,0005 cm a 46 cm	Al menos 10.000 G	2 horas	Al menos el 99%

Si bien se han descrito varias realizaciones, se le ocurrirá a una persona con conocimientos ordinarios de la técnica la posibilidad de realizar modificaciones a las realizaciones divulgadas. Es la intención que el ámbito de la invención se defina por las reivindicaciones que se acompañan.

5 Apéndice A

Los agentes biológicamente activos que pueden estar presentes en las soluciones o disolventes de la presente invención, son cualesquiera sustancias que tengan actividad biológica, incluyendo pequeñas moléculas, compuestos químicos, proteínas, polipéptidos, polinucleótidos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, lipoproteínas y sustancias análogas a estos obtenidas por ingeniería biológica.

10 Ejemplos de compuestos biológicamente activos que pueden estar comprendidos en las soluciones de la presente invención, incluyen literalmente cualquier compuesto biológicamente activo hidrófilo o hidrófobo. Preferiblemente, aunque no necesariamente, el medicamento es uno que ya haya sido considerado seguro y de uso eficaz por la agencia o autoridad gubernamental apropiada. Por ejemplo, pueden ser medicamentos para uso humano listados por la FDA [Administración de Alimentos y Medicamentos –“Food and Drug Administration”] bajo la norma 21 C. F. R. [Código de Regulaciones Federales, Título 21].

15 Los puntos 330.5, 331 a 361; 440-460; medicamentos para uso veterinario listados por la FDA bajo la norma 21 C. F. R. 500-582, incorporados aquí como referencia, se consideran, todos ellos, aceptables para uso en las novedosas redes poliméricas actuales.

20 Medicamentos que no son líquidos por sí mismos a la temperatura corporal pueden incorporarse en, y pueden comprender, las soluciones de la presente invención y otros polímeros. Es más, péptidos y proteínas que pueden, normalmente, ser fragmentados por enzimas activadas por tejido, tales como peptidasas, pueden ser protegidos pasivamente dentro de polímeros o pueden comprender las soluciones de la presente invención.

25 La expresión “compuesto activo biológicamente” incluye sustancias farmacológicamente activas que producen un efecto local o sistémico en animales, plantas o virus. La expresión significa, por tanto, cualquier sustancia destinada a utilizarse en los diagnósticos, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades, o en la mejora del desarrollo y las condiciones físicas o mentales deseables en un animal, planta o virus. El término “animal” que aquí se utiliza se ha tomado con el significado de mamíferos, tales como primates, incluyendo los humanos, ovejas, caballos, ganado vacuno, cerdos, perros, gatos, ratas, ratones; pájaros; reptiles; peces; insectos; arácnidos; protistas (por ejemplo, protozoos); y bacterias procarióticas. El término “planta” significa plantas superiores (angiospermas, gimnospermas), hongos y “algas” verde-azuladas procarióticas (es decir, cianobacterias).

30 El compuesto biológicamente activo puede ser cualquier sustancia que tenga una actividad biológica, incluyendo proteínas, polipéptidos, polinucleótidos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, lipoproteínas y sustancias análogas a estas, sintéticas y fabricadas por ingeniería biológica. El término “proteína” está reconocido en la técnica y, para los propósitos de esta invención, también abarca los péptidos. Las proteínas o péptidos pueden ser cualquier proteína o péptido biológicamente activo, presente en la naturaleza o sintético. Ejemplos de proteínas incluyen anticuerpos, enzimas, esteroides, hormona de crecimiento y hormona de liberación de la hormona de crecimiento, hormona de liberación de gonadotropina, y sus análogos agonistas y antagonistas, somatostatina y sus análogos, gonadotropinas tales como la hormona luteinizante y la hormona estimuladora del folículo, péptido-T, tirocalcitonina, hormona paratiroidea, glucagona, vasopresina, oxitocina, angiotensina I y II, bradiquinina, kallidina, hormona adrenocorticotrópica, hormona de estimulación tiroidea, insulina, glucagona y los numerosos análogos y congéneres de las moléculas anteriores.

35 Clases de compuestos biológicamente activos que pueden ser cargados en geles de enlaces transversales utilizando los métodos de la presente invención, incluyen, si bien no están limitados a ellos, sustancias anti-SIDA, sustancias anticáncer, antibióticos, inmunosupresores (por ejemplo, la ciclosporina) y sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistaminas, lubricantes tranquilizadores, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias contra el Parkinson, antiespasmódicos y contractores musculares, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, agentes antipiréticos y antiinflamatorios tales como los NSAIDs, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antisicóticas, antieméticos, agentes para la formación de imágenes, agentes específicos de objetivo, neurotransmisores, proteínas, modificadores de la respuesta de células, y vacunas.

50

Un listado más completo de las clases de compuestos adecuados para cargar en el seno de polímeros utilizando los presentes métodos, puede encontrarse en la Pharmazeutische Wirkstoffe (Von Kleemann et al. (eds) Stuttgart / Nueva York, 1987, incorporada aquí como referencia).

5 Ejemplos de sustancias biológicamente activas particulares se presentan más adelante: las sustancias anti-SIDA son sustancias que se utilizan para tratar el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Ejemplos de tales sustancias incluyen CD4,3'-azido-3'-deoxitimidín (AZT),9'-(2-hidroxi-etoximetil)-guanín aciclovir, ácido fosfonofórmico, 1-adamantanamina, péptido T, y 2',3' dideoxicitidina.

10 Las sustancias anticáncer son sustancias que se emplean para tratar o prevenir el cáncer. Ejemplos de tales sustancias incluyen metotrexato, cisplatina, prednisona, hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, dietilestilbestrol, propionato de testosterona, fluoximesterona, vinblastina, vincristina, vindesina, daunorrubicina, doxorubicina, hidroxiurea, procarbacin, aminoglutetimida, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalano, mostaza de uracilo, clorambucilo, busulfano, carmustina, lomustina, dacarbacin (DTIC: dimetiltriacenomidazolecarboxamida), metotrexato, fluorouracilo, 5-fluorouracilo, citarabina, arabinóxido de citosina, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, tioguanina.

15 Los antibióticos están reconocidos en la técnica y son sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos o los matan. Los antibióticos pueden ser producidos sintéticamente o por microorganismos.

Ejemplos de antibióticos incluyen penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, minociclina, doxiciclina, vanomicina, bacitracina, kanamicina, neomicina, gentamicina, eritromicina y cefalosporinas.

20 Los agentes antivirales son sustancias capaces de destruir o suprimir la replicación de virus. Ejemplos de agentes antivirales incluyen α -metil-P-adamantanometilamina, 1,-D-ribofuranosil-1,2, 4-triazol-3 carboxamida,9- [2-hidroxi-etoxi] metilguanina, adamantanamina, 5-yodo-2'-deoxiuridina, trifluorotimidina, interferón, y adenina arabinosida.

25 Los inhibidores enzimáticos son sustancias que inhiben una reacción enzimática. Ejemplos de inhibidores enzimáticos incluyen cloruro de edrofonio, N-metilfisostigmina, bromuro de neostigmina, sulfato de fisostigmina, tacrina HCl, tacrina, l-hidroxi-maleato, iodotubercidina, hidrocloreto de p-bromotetramisol, 10- (alfa-dietilaminopropionil)- fenotiacina, cloruro de calmidazolol, hemicolinio-3, 3, 5-dinitrocatecol, inhibidor I de diacilglicerol quinasa, inhibidor II de diacilglicerol quinasa, fenilpropargilamina, acetato de N6-monometil-L-arginina, carbidopa, 3-hidroxi-bencilhidracina HCl, hidralacina HCl, clorgilina HCl, deprenilHCl, L(-)-,deprenilHCl, D(+)-, hidroxilamina HCl, fosfato de iproniazida, 6-MeO-tetrahydro-9H-pirido-indol, nialamida, pargilinaHCl, quinacrinaHCl, semicarbazida HCl, tranilcipromida HCl, hidrocloreto de N, N-dietilaminoetil-2,2-difenilvalerato, 3-isobutil-1-metilxantano, papaverinaHCl, hidrocloreto de indometacin,2-ciclooctil-2-hidroxi-etilamina, 2,3-dicloro-a-metilbencilamina (DCMB), hidrocloreto de 8,9-dicloro-2,3,4,5-tetrahydro-1H-2-benzacepina, p-aminoglutetimida, tartrato de p-aminoglutetimida, tartrato de R (+) -, p-aminoglutetimida, S (-)-, 3-iodotirosina, alfa-metiltirosina, L-,alfa-metiltirosina, D L-,acetazolamida, diclorofenamida, 6-hidroxi-2-benzotiazolsulfonamida, y alopurinol.

35 Las neurotoxinas son sustancias que tienen un efecto tóxico en el sistema nervioso, por ejemplo, en las células nerviosas. Las neurotoxinas incluyen neurotoxinas adrenérgicas, neurotoxinas colinérgicas, neurotoxinas dopaminérgicas y otras neurotoxinas. Ejemplos de neurotoxinas adrenérgicas incluyen hidrocloreto de N- (2-cloroetil)-N-etil-2-bromobencilamina. Ejemplos de neurotoxinas colinérgicas incluyen hidrocloreto de mostaza de acetiletilcolina. Ejemplos de neurotoxinas dopaminérgicas incluyen 6-hidroxi-dopamina HBr, hidrocloreto de 1-metil-4-(2-metilfenil)-1,2,3,6-tetrahydro-piridina, perclorato de 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio, N-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropindina HCl, yoduro de 1-metil-4-fenilpiridinio.

Los opioides son sustancias que tienen efectos similares a los opiáceos, pero que no se derivan del opio.

45 Los opioides incluyen agonistas opioides y antagonistas opioides. Los agonistas opioides incluyen sulfato de codeína, citrato de fentanilo, bitartrato de hidrocodona, loperamida HCl, sulfato de morfina, noscapina, norcodeína, normorfina, tebaína. Los antagonistas opioides incluyen norbinaltorfiminaHCl, buprenorfina, clonaltrexamina2HCl, funaltrexamina HCl, nalbufina HCl, nalorfina HCl, naloxona HCl, naloxonacina HCl, andnaltrindol HCl.

Los hipnóticos son sustancias que producen un efecto hipnótico. Los hipnóticos incluyen pentobarbital sodio, fenobarbital, secobarbital, tiopental y mezclas de los mismos, heterocicliquinópticos, dioxopiperidinas, glutarimidias, dietil isovaleriamida, α -bromoisovaleril urea, uretanos y disulfanos.

Las antihistaminas son sustancias que inhiben competitivamente los efectos de las histaminas.

50 Ejemplos de ellas incluyen la pirlamina, clorfeniramina, tetrahidrazolina y sustancias similares. Los lubricantes son sustancias que aumentan la lubricidad del entorno en el que son suministradas. Ejemplos de lubricantes biológicamente activos incluyen agua y solución salina.

Los tranquilizantes son sustancias que proporcionan un efecto tranquilizador. Ejemplos de tranquilizantes incluyen cloropromacina, promacina, flufenzaína, reserpina, deserpidina y meprobamato.

- Los anticonvulsivos son sustancias que tienen un efecto de prevenir, reducir o eliminar las convulsiones. Ejemplos de tales agentes incluyen primidona, fenitoína, valproato, Chk andetosuximida.
- 5 Los relajantes musculares y los agentes contra el Parkinson son agentes que relajan los músculos, o reducen o eliminan los síntomas asociados a la enfermedad de Parkinson. Ejemplos de tales agentes incluyen mefenesina, metocarbomal, hidrocloreuro de ciclobenzaprina, hidrocloreuro de trihexilfenidilo, levodopa / carbidopa, y biperideno.
- Los antiespasmódicos y contractores musculares son sustancias capaces de prevenir o aliviar los espasmos o contracciones musculares. Ejemplos de tales agentes incluyen atropina, escopolamina, oxifenonio y papaverina.
- 10 Los anticolinérgicos mióticos son compuestos que provocan la broquiodilatación. Ejemplos de ellos incluyen ecotiofato, pilocarpina, salicilato de fisostigmina, diisopropilfluorofosfato, epinefrina, neostigmina, carbacol, metacolina, betanecol y compuestos similares.
- Los compuestos antiglaucoma incluyen betaxalol, pilocarpina, timolol, sales de timolol y combinaciones de timolol y/o sus sales con pilocarpina.
- Los antiparasitarios, antiprotozoos y antihongos incluyen ivermectina, pirimetamina, trisulfapirimidina, clindamicina, anfotericina B, nistatina, flucitossina, natamicina y miconazol.
- 15 Los antihipertensivos son sustancias capaces de contrarrestar la elevada presión de la sangre.
- Ejemplos de tales sustancias incluyen la alfa-metildopa y el pivaloiloxietil éter de alfa-metildopa.
- Los analgésicos son sustancias capaces de prevenir, reducir y aliviar el dolor. Ejemplos de analgésicos incluyen sulfato de morfina, sulfato de codeína, meperidina y nalorfina.
- 20 Los antipiréticos son sustancias capaces de aliviar o reducir la fiebre, y los agentes antiinflamatorios son sustancias capaces de contrarrestar o suprimir la inflamación. Ejemplos de tales agentes incluyen aspirina (ácido salicílico), indometacina, indometacintrihidrato de sodio, salicilamida, naproxeno, colquicina, fenoprofeno, sulindaco, diflunisal, diclofenaco, indoprofeno y salicilamida de sodio.
- Los anestésicos locales son sustancias que tienen un efecto anestésico en una región localizada.
- Ejemplos de tales anestésicos incluyen procaína, lidocaína, tetracaína y dibucaína.
- 25 Los agentes oftálmicos incluyen agentes para diagnóstico tales como fluoresceína de sodio, rosa de Bengala, metacolina, adrenalina, cocaína y atropina. Los aditivos quirúrgicos oftálmicos incluyen alfa-quitotripsina y hialuronidasa.
- Las prostaglandinas están reconocidas en la técnica y son una clase de ácidos grasos hidroxídicos de cadena larga y relacionados químicamente, que se dan en la naturaleza y que presentan una variedad de efectos biológicos.
- 30 Los antidepresivos son sustancias capaces de prevenir o aliviar la depresión. Ejemplos de antidepresivos incluyen imipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, desipramina, amoxapina, doxepina, maprotilina, tranilcipromina, fenelcina e isocarboxácida.
- Las sustancias antisicóticas son sustancias que modifican el comportamiento sicótico. Ejemplos de tales agentes incluyen fenotiacinas, butirofenonas y tioxantenos.
- 35 Los antieméticos son sustancias que previenen o alivian las náuseas o el vómito. Un ejemplo de tal sustancia incluye la dramamina.
- Los agentes para la formación de imágenes son agentes capaces de formar una imagen de un lugar deseado, por ejemplo, un tumor, en vivo. Ejemplos de agentes para la formación de imágenes incluyen sustancias que tienen una etiqueta o marcador que es detectable en vivo, por ejemplo, anticuerpos fijados a marcadores fluorescentes. El término anticuerpo incluye anticuerpos completos o fragmentos de los mismos.
- 40 Los agentes específicos de objetivo incluyen agentes capaces de suministrar un agente terapéutico a un lugar deseado, por ejemplo, un tumor, y proporcionar un efecto terapéutico. Ejemplos de agentes de objetivo incluyen agentes que pueden transportar toxinas u otros agentes que proporcionan efectos beneficiosos.
- El agente de objetivo puede ser un anticuerpo asociado a una toxina, por ejemplo ricino A, o un anticuerpo asociado a un medicamento.
- 45 Los neurotransmisores son sustancias que son liberadas desde una neurona al excitarse esta, y que se desplazan ya sea para inhibir una célula de objetivo, ya sea para excitarla. Ejemplos de neurotransmisores incluyen dopamina, serotonina, ácido q-aminobutírico, norepineprina, histamina, acetilcolina y epinefrina.

5 Los modificadores de la respuesta de células son factores quimiotácticos tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF –“platelet-derived growth factor”). Otros factores quimiotácticos incluyen proteína activadora de neutrófilo, proteína quimioatrayente de monocitos, proteína inflamatoria macrófaga, factor de plaquetas, proteína básica de plaquetas, y actividad simuladora del crecimiento de melanoma; factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformador (alfa), factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de células endoteliales obtenido de plaquetas, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento nervioso, y factor inductor del crecimiento óseo / cartílagos (alfa y beta), u otras proteínas morfogenéticas del hueso.

10 Otros modificadores de la respuesta de células son las interleuquinas, los inhibidores de interleuquina o los receptores de interleuquina, incluyendo desde la interleuquina 1 hasta la interleuquina 10; interferonas, incluyendo las alfa, beta y gamma; factores hematopoyéticos, incluyendo la eritropoyetina, factor de estimulación de las colonias de granulocitos, factor de estimulación de las colonias de macrófagos, y factor de estimulación de las colonias de granulocitos-macrófagos; factores de necrosis de tumores, incluyendo alfa y beta; factores de crecimiento de transformación (beta), incluyendo beta-1, beta-2 y beta-3, inhibina y activina, y proteínas morfogenéticas de los huesos, incluyendo todas las BMPs [“Bone Morphogenetic Proteins”].

15

20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para dejar inactivos y/o reducir los agentes patógenos contenidos en tejido que tiene una pluralidad de cavidades en las que residen los agentes patógenos, el cual comprende centrifugar el tejido en una centrifugadora de flujo continuo con una solución de reducción de agentes patógenos, de tal manera que la solución se hace fluir continuamente al interior de la centrifugadora y se extrae continuamente de la centrifugadora que contiene el tejido, y de tal modo que dicha centrifugación produce una fuerza G sobre el material que es suficiente para eliminar los contaminantes y materiales de desecho del tejido y favorecer la penetración de la solución en el tejido, de manera que la centrifugación hace que la solución de reducción de agentes patógenos penetre en sustancialmente todas las cavidades del tejido en las que residen los agentes patógenos, a fin de dejar con ello inactivos y/o reducir el contenido de los agentes patógenos dentro de dichas cavidades.
- 10 2.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye exponer el tejido a un volumen de dicha solución de reducción que es mayor que 3 litros.
- 3.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la fuerza G supera 1.000 G.
- 15 4.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye centrifugar en seco el tejido tras la centrifugación de la solución de reducción de agentes patógenos, a fin de eliminar trazas de disolventes y de residuos.
- 5.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el tejido es al menos uno de entre hueso esponjoso, hueso cortical y hueso de unión.
- 20 6.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la solución de reducción de agentes patógenos comprende al menos una solución de desactivación de agentes patógenos virales y/o bacterianos, destinada a dejar inactivos los agentes patógenos.
- 25 7.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la solución de reducción de agentes patógenos está destinada a dejar inactivos agentes patógenos virales y/o bacterianos, la centrifugación a hacer fluir la solución de reducción para eliminar mediante lavado por circulación los agentes patógenos de las cavidades y dejar inactivos los agentes patógenos dentro de las cavidades, y, a continuación, eliminar la solución de reducción que transporta los agentes patógenos eliminados mediante lavado por circulación, de las proximidades del tejido.
- 30 8.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el tejido comprende hueso, los agentes patógenos comprenden lípidos y/o proteínas, y la solución de reducción de agentes patógenos está destinada a eliminar los lípidos y/o proteínas del hueso, de tal manera que el procedimiento comprende hacer fluir continuamente y centrifugar la solución de reducción de agentes patógenos con el hueso, de modo que la solución se infunde continuamente dentro y fuera de las cavidades del hueso, a fin de eliminar continuamente mediante lavado por circulación los lípidos y/o las proteínas del hueso.
- 35 9.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tejido comprende hueso, los agentes patógenos comprenden lípidos y/o proteínas contenidos en las cavidades del tejido, y el procedimiento está destinado a disolver los lípidos y/o las proteínas mediante la centrifugación del hueso con la solución de reducción de agentes patógenos, a fin de hacer que la solución de reducción de agentes patógenos fluya al interior de sustancialmente todas las cavidades del tejido.
- 40 10.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye infundir sustancias útiles biológica y/o mecánicamente en las cavidades del tejido durante una etapa de centrifugación.
- 45 11.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la etapa de infusión incluye infundir al menos un antibiótico para formar un preservador o conservante del tejido durante el almacenamiento del tejido.
- 12.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la etapa de infusión incluye infundir al menos un antibiótico que constituye un conservante del tejido durante el almacenamiento del tejido, y al menos un factor de crecimiento del tejido destinado a ser liberado del tejido tras la implantación del tejido en un animal.
- 50 13.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la etapa de infusión de la sustancia mecánicamente útil incluye infundir un agente plastificante para mantener la flexibilidad o capacidad de doblamiento del tejido tras un secado de congelación o un secado.
- 14.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la etapa de infusión de la sustancia mecánicamente útil incluye infundir glicerol para mantener la capacidad de doblamiento del tejido tras un secado de congelación o un secado.
- 15.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la etapa de infusión de la sustancia mecánicamente útil incluye infundir materiales de mejora estructural, que son endurecidos térmica o químicamente.

16.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la etapa de infusión de la sustancia mecánicamente útil incluye infundir polímeros, que se endurecen térmica o químicamente.

17.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, que incluye infundir una sustancia químicamente reactiva tal como un agente oxidante, a fin de romper o descomponer los lípidos y/o las proteínas.

5 18.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la solución de reducción de agentes patógenos se selecciona de al menos uno del grupo consistente en un alcohol, un detergente, un oxidante, un disolvente y un agente surfactante o tensoactivo.