

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 706**

51 Int. Cl.:
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09156289 .2**
- 96 Fecha de presentación: **26.03.2009**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2105149**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2009**

54 Título: **Una preparación de hueso humano, su preparación y uso**

30 Prioridad:
27.03.2008 IT FI20080058

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

73 Titular/es:
**TISSUELAB S.P.A.
STRADA STATLE 7 BIS KM 19,5
80029 S. ANTIMO, IT**

72 Inventor/es:
**Ramelli, Massimiliano;
Della Valle, Elena y
Mariniello, Renato**

74 Agente/Representante:
Ruo, Alessandro

ES 2 377 706 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

Una pasta de hueso humano, su preparación y uso.

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de productos que tienen propiedades ósteo-inductoras

5 Estado de la técnica

[0002] Los avances en la cirugía han conducido a un aumento en el uso de injertos, o implantes de tejido óseo, para fines de relleno o soporte, en la reparación del hueso y la cirugía de reconstrucción. En procedimientos de reconstrucción, en los que está implicada una pérdida de materia ósea, el cirujano ortopédico puede seleccionar el material más adecuado y eficaz para un fin dado, de entre diversos tipos de hueso y sus derivados.

10 [0003] Hablando en general, en vez de usar tejido óseo autólogo, es preferible usar tejido homólogo recogido de un donante vivo o muerto, distribuido por bancos tisulares acreditados.

15 [0004] Un tipo particular de injerto óseo es la llamada matriz de hueso desmineralizada (DBM), descrita por primera vez por Senn en 1889. Ésta consiste en la parte proteica del hueso, sin su componente mineral; el proceso de desmineralización expone los factores ósteo-inductores, tales como las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), a los tejidos circundantes, induciendo de este modo neogénesis ósea. Una de las desventajas asociadas con el uso de DBM, sin embargo, está en que las dimensiones de los gránulos constituyentes es tal que se hace difícil para ellos permanecer en el área en la que se han trasplantado y tienden a migrar; además, tienen una textura superficial rugosa que los hace difíciles de manipular durante el procedimiento quirúrgico.

20 [0005] Como consecuencia, uno de los objetos de la investigación en años recientes ha sido obtener un producto, tal como una pasta de tejido óseo, que no sea susceptible de migración y que sea fácil de usar en el quirófano.

[0006] Las pastas de hueso son un tipo particular de sustituto de hueso y están disponibles en la actualidad diversas preparaciones que son distinguibles por su formulación; el principal componente de estas preparaciones, sin embargo, puede ser cerámica o tejido óseo homólogo.

25 [0007] La cerámica es material inorgánico que proporciona una matriz para la formación de nuevo tejido óseo en el sitio de un procedimiento quirúrgico. Estos materiales inorgánicos incluyen hidroxiapatita coralina, hidroxiapatita sintética y fosfato tricálcico; se asemejan a la hidroxiapatita ósea natural y se consideran matrices ósteo-conductoras válidas, especialmente cuando se usan como relleno.

30 [0008] Puesto que la cerámica por sí sola es difícil de manipular durante los procedimientos quirúrgicos, las formas que se encuentran en el mercado generalmente están mezcladas con sustancias que les dan una consistencia pastosa y las hace más fáciles de manipular, es decir, más dúctiles y más adaptables al sitio del injerto (C.P. Desilets, *et al.*, "Development of synthetic bone-repair materials for craneofacial reconstruction", J. Craniofacial Surgery, Vol. 1 (3), 1990, páginas 150-153).

35 [0009] Los materiales inorgánicos que forman las pastas no tienen propiedades ósteo-inductoras, pero son ósteo-conductores puesto que tienen la capacidad de facilitar la difusión de factores trópicos y células en el área del injerto y proporcionar soporte mecánico para el tejido de nueva formación, pero pueden ser biológicamente inertes. De hecho, algunos de estos materiales, tales como sulfato cálcico y fosfato cálcico, son lentamente bioabsorbibles, mientras que otros no se reabsorben sino que se encapsulan como un cuerpo ajeno en el hueso natural.

40 [0010] Entre los diversos tipos de pasta, preparados con tejido óseo disponibles en la actualidad, cabe mencionar GRAFTON.RTM®: éste es un gel que consiste en glicerol (79-85 %) y polvo de hueso desmineralizado y liofilizado (15-21 %), en el que los gránulos tienen una distribución de tamaño de partícula que está entre 0,1 y 1,2 cm. El producto es eficaz para rellenar cavidades pequeñas o grietas de hueso, pero tiene la desventaja de migrar rápidamente del sitio en el que se implanta debido a la viscosidad y solubilidad del glicerol.

45 [0011] El documento WO 2007/056671 A1 describe un injerto de hueso hemostático biocompatible que contiene hueso desmineralizado y una sustancia cerosa, tal como polietilenglicol. Puede añadirse glicerol al material ceroso en algunas realizaciones. Usando una matriz de hueso desmineralizada en forma de masilla permite al cirujano moldear el material en o cerca de hueso, lo que puede permitir y promover el crecimiento del hueso.

50 [0012] A la luz de las consideraciones anteriores, es por lo tanto claramente evidente que necesitan desarrollarse nuevos materiales para satisfacer mejor los requisitos de operarios del sector y particularmente en forma de pastas que sean fáciles de manipular por el cirujano y capaces de permanecer en el sitio quirúrgico, permitiendo la inducción de nuevo tejido óseo especialmente cuando se usa como un relleno en cavidades y grietas del hueso, y defectos de consolidación en fracturas de hueso largo.

Sumario de la invención

[0013] Se describe una pasta de hueso humano que comprende un hueso cortical desmineralizado homólogo de origen humano en forma de un polvo, con glicerol y PEG.

Descripción detallada de la invención

5 **[0014]** La presente invención permite que se superen los problemas anteriormente mencionados por medio de una pasta de hueso humano que comprende: un hueso cortical desmineralizado homólogo de origen humano en forma de un polvo, con glicerol y PEG. Dicho polvo desmineralizado preferiblemente tiene un contenido de calcio de menos del 5 % en peso. De acuerdo con la invención, el término PEG se usa para referirse a polietilenglicol que tiene un peso molecular comprendido, por ejemplo, entre 3000 y 6000 y se prefiere particularmente PEG 4000, puesto que es capaz de proporcionar a la pasta suficiente viscosidad para hacerla particularmente adecuada para su uso en cirugía ortopédica.

[0015] De acuerdo con la invención, los tres componentes anteriormente mencionados pueden contenerse en las siguientes proporciones:

Polvo de hueso	20 %/-40 %
PEG	25 %/-45 %
Glicerol	25 %/-45 %

[0016] La pasta de acuerdo con la invención preferiblemente comprende la siguiente composición:

Polvo de hueso	30 %
PEG	35 %
Glicerol	35 %

15 **[0017]** El polvo de hueso se obtiene de acuerdo con métodos conocidos, comenzando con tejido óseo cortical seco, por medio de un proceso de pulverización tisular por medio de una máquina de molienda de hueso.

20 **[0018]** El polvo resultante se somete a tres exploraciones (que duran 5 minutos, después 2 minutos y 2 minutos), usando un molino vibro-energy y exploraciones adecuadas para obtener un polvo de hueso con una distribución de tamaño de partícula que está entre 125 µm - 850 µm. El polvo de hueso se desmineraliza por medios de tratamientos repetidos del mismo, con soluciones ácidas inorgánicas (sulfúrico, clorhídrico, fosfórico). Se prefiere particularmente ácido clorhídrico, en porcentajes dados y para tiempos preseleccionados. Después el polvo tratado se aclara, se trata con tampón fosfato y finalmente se aclara de nuevo.

25 **[0019]** Se realizan preferiblemente cuatro lavados posteriores con HCl 0,6 N, manteniendo el ácido en contacto con el polvo y agitando la mezcla durante 15 minutos en el primer lavado, 30 minutos en el segundo lavado y 2 horas en los últimos dos lavados.

[0020] Preferiblemente, la proporción de polvo a HCl es 1:8 para cada ciclo.

[0021] Al final de cada ciclo de lavado, el polvo de hueso se deja asentar (sin agitación) y el sobrenadante se retira por medio de una bomba de succión.

30 **[0022]** Después del último lavado con HCl, el polvo se aclara dos veces en agua purificada para inyecciones (WFI), preferiblemente en proporciones de 1:10 y permitiendo 15 minutos para cada lavado.

[0023] Después el polvo se trata al menos dos veces con una solución de tampón a un pH neutro, tal como un tampón de fosfato monobásico 0,2 M, pH 7,0, preferiblemente en proporciones de 1:2, de modo que el pH final del polvo esté comprendido entre 6,8 y 7,2.

35 **[0024]** Finalmente, el polvo se somete a dos lavados consecutivos con agua purificada durante 10 minutos cada uno, con el polvo y agua preferentemente en proporciones de 1:10.

[0025] El procedimiento anteriormente descrito da lugar a un polvo con un contenido de calcio de menos de 5 %, que se seca posteriormente.

[0026] El polvo resultante se añade después a una solución de glicerol y PEG en las proporciones anteriormente indicadas.

40 **[0027]** La solución de glicerol y PEG se obtiene mezclando y calentando los dos componentes (preferiblemente a aproximadamente 70 °C), agitando para obtener una solución homogénea que después se deja enfriar a aproximadamente 60 °C. Después el polvo seco previamente obtenido por medio del proceso de desmineralización

se añade, agitando para obtener una pasta homogénea.

[0028] La pasta se distribuye después en dosis variables en dispositivos de distribución especiales (carpoules) que son selladas al vacío en una bolsa doble de aluminio/polipropileno.

5 **[0029]** Los carpoules se insertan después en un recipiente de aislamiento de espuma de poliuretano, dispuestos con hielo seco entre ellos y se someten a un tratamiento de esterilización con radiación gamma generada por una fuente de Cobalto 60. La dosis de ionización usada normalmente es 60 kGy.

[0030] Los carpoules se almacenan después a temperatura ambiente (15 °C-30 °C) hasta su uso.

[0031] La invención se explica ahora mejor por medio de ejemplos específicos que se proporcionan a continuación (en los ejemplos, la pasta de hueso de acuerdo con la invención también se denomina TBP).

10 Ejemplo 1

15 **[0032]** Se secaron 488,9 gramos de tejido óseo cortical homólogo de un donante humano en el secador (RETSCH mod. AS100); después de 30 minutos a 37 °C, el peso del tejido alcanzaba los 458,6 gramos. Después el tejido seco se molió en la máquina TMI (mod. ABG07); después de la molienda, los 425,0 gramos resultantes de polvo se exploraron tres veces en el molino vibro-energy RETSCH (mod. AS200). Después de la exploración, se obtuvieron 400,5 gramos de polvo (125 µm – 850 µm).

20 **[0033]** En la etapa de desmineralización posterior, el polvo se vertió en un recipiente estéril, se añadieron 3,2 l de HCl 0,6 N (en una relación de 1:8) y los contenidos se agitaron durante 15 minutos. Después del intervalo de tiempo establecido, el agitador se apagó y se permitió que el polvo se asentara, después se retiró el sobrenadante. Se añadieron otros 3,204 l de HCl 0,6 y se repitió el mismo ciclo de tratamiento durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces más, ciclos durante los cuales el polvo se trató con ácido clorhídrico durante 2 horas.

[0034] Después del último tratamiento con ácido clorhídrico, la agitación se detuvo para permitir que el polvo se asentara, el sobrenadante se retiró y el polvo se sometió a dos ciclos de lavado consecutivos durante 15 minutos cada uno, usando 4,9 l de agua purificada (1:10) para cada ciclo.

25 **[0035]** Después, el polvo se lavó dos veces más, usando para cada ciclo 0,8 l de tampón fosfato monobásico 0,2 M, pH 7,0 (1:2). Después de los tratamientos con el tampón, el pH de la solución fue de 7,1. Finalmente, el polvo se aclaró dos veces con 4,0 l de agua purificada (1:10) durante 10 minutos.

[0036] Después del proceso de extracción química, el contenido de calcio determinado en el polvo fue de 0,4 % (método colorimétrico – Arsenazo III).

30 **[0037]** El polvo desmineralizado húmedo (549,9 g) se secó (secador RETSCH mod. AS100) durante 30 minutos a 37 °C. Puesto que el peso del polvo seco alcanzaba 295,0 g, los otros componentes de la pasta (TBP) se pesaron para conseguir las siguientes proporciones:

COMPONENTES DE LA TBP	PORCENTAJE (%)	PESO (gramos)
Polvo DBM	30	295,0
Glicerol	35	342,2
PEG4000	35	342,2

35 **[0038]** El PEG pesado y el glicerol se vertieron en un recipiente y se calentaron (+70 °C ± 5 °C) agitando a la vez para obtener una solución homogénea. Después se detuvo la agitación y, una vez que la solución se había enfriado a una temperatura de +60 °C, se añadió el polvo seco. Los tres componentes se mezclaron juntos con una paleta para obtener una pasta homogénea.

[0039] Al final del proceso, el peso de la TBP fue de 1.017,4 gramos. La pasta obtenida de este modo se distribuyó en carpoules de 2,5 cm³, 5,0 cm³ y 10,0 cm³.

40 **[0040]** Los carpoules llenos se sellaron después dentro de una bolsa doble y se sometieron a un tratamiento de inactivación viral con reacción gamma.

Ejemplo 2

[0041] Después de 30 minutos a +37 °C (secador RETSCH mod. AS100), se redujeron 552,4 gramos de tejido óseo cortical homólogo de un donante humano a 520,8 gramos.

5 **[0042]** El tejido seco se molió en la máquina TMI (mod. ABG07) y, al final del proceso de molienda, los 484,1 gramos de polvo obtenidos se exploraron tres veces en el molino vibro-energy RETSCH (mod. AS200), dando lugar a 461,7 gramos de polvo (125 µm – 850 µm) al final de la exploración.

10 **[0043]** Para el proceso de desmineralización, el polvo se vertió en un recipiente estéril, añadiendo 3,7 l de HCl 0,6 N (en una relación de 1:8) y agitando durante 15 minutos. Después de 15 minutos, el agitador se apagó y se dejó que el polvo se asentara, después se retiró el sobrenadante. Después se añadieron otros 3,7 l de HCl 0,6 y se repitió el ciclo de tratamiento durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces más, ciclos durante los cuales el polvo se trató con ácido clorhídrico durante 2 horas (1:8).

[0044] Después del cuarto tratamiento con ácido clorhídrico, la agitación se detuvo para permitir que el polvo se asentara, el sobrenadante se retiró y el polvo se sometió a dos ciclos de lavado consecutivos durante 15 minutos cada uno, usando 4,6 l de agua purificada (1:10).

15 **[0045]** El polvo se lavó posteriormente dos veces más, usando 0,9 l de tampón fosfato monobásico 0,2 M, pH 7,0 (1:2). Al final del tratamiento con el tampón, el pH de la solución fue de 6,9. Finalmente, el polvo se aclaró dos veces con 4,6 l de agua purificada (1:10) durante 10 minutos. Tras completar del proceso de extracción química, el contenido de calcio determinado en el polvo alcanzó 0,7 % (método colorimétrico – Arsenazo III).

20 **[0046]** El polvo desmineralizado húmedo que pesaba 683,1 gramos se secó (secador RETSCH mod. AS100) durante 30 minutos a 37 °C. Puesto que el peso del polvo seco fue de 278,2 gramos, los otros componentes de la TBP se pesaron basándose en las siguientes proporciones:

COMPONENTES DE LA TBP	PORCENTAJE (%)	PESO (gramos)
Polvo DBM	30	278,2
Glicerol	35	322,7
PEG4000	35	322,7

25 **[0047]** Primero se vertió PEG y glicerol pesados en un recipiente y se calentaron (+70 °C ± 5 °C) agitando a la vez para obtener una solución homogénea. Después se detuvo la agitación y, una vez que la solución se había enfriado a una temperatura de +60 °C, se añadió el polvo seco. Los tres componentes se mezclaron juntos con una paleta para obtener una pasta homogénea. Al final del proceso, el peso de la TBP fue de 911,4 gramos. La pasta obtenida de este modo se distribuyó en carpoules de 2,5 cm³, 5,0 cm³ y 10,0 cm³.

[0048] Los carpoules llenos se sellaron después dentro de una bolsa doble y se sometieron a un tratamiento de inactivación viral por medio de reacción gamma.

30 Ejemplo 3

[0049] 583,4 gramos de tejido óseo cortical homólogo de un donante humano, obtenido a partir de 615,7 gramos de tejido secado durante 30 minutos a +37 °C (secador RETSCH mod. AS100), se molieron en la máquina TMI (mod. ABG07). Al final del proceso de molienda, se obtuvieron 545,0 gramos de polvo, que se exploraron tres veces en el molino vibro-energy RETSCH (mod. AS200), dando lugar a 511,7 gramos de polvo (125 µm – 850 µm) al final de la exploración.

35 **[0050]** El polvo explorado se vertió en un recipiente estéril, añadiendo 4,1 l de HCl 0,6 N (en una relación de 1:8) y agitando durante 15 minutos. Después de 15 minutos, el agitador se apagó y se permitió que el polvo se asentara, después el sobrenadante se retiró. Después se añadieron otros 4,1 l de HCl 0,6 y el ciclo de tratamiento se repitió durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces más, ciclos durante los cuales el polvo se trató con ácido clorhídrico durante 2 horas (1:8).

40 **[0051]** Después del cuarto tratamiento con ácido clorhídrico, la agitación se detuvo para permitir que el polvo se asentara, el sobrenadante se retiró y el polvo se sometió a dos ciclos de lavado consecutivos durante 15 minutos cada uno, usando 5,1 l de agua purificada (1:10).

45 **[0052]** Después, el polvo se lavó dos veces más con 1,0 l de tampón fosfato monobásico 0,2 M, pH 7,0 (1:2). Al final del tratamiento con el tampón, el pH de la solución fue de 6,9. Después el polvo se aclaró dos veces con 5,1 l de agua purificada (1:10) durante 10 minutos. Tras la compleción del proceso de extracción química, el contenido de calcio determinado en el polvo alcanzaba 1,4 % (método colorimétrico – Arsenazo III).

ES 2 377 706 T3

[0053] El polvo desmineralizado húmedo que pesaba 683,8 gramos se secó (secador RETSCH mod. AS100) durante 30 minutos a 37 °C. Puesto que el peso del polvo seco era de 295,1 gramos, los otros componentes de la TBP se pesaron basándose en las siguientes proporciones:

COMPONENTES DE LA TBP	PORCENTAJE (%)	PESO (gramos)
Polvo DBM	30	295,1
Glicerol	35	342,3
PEG4000	35	342,3

5 **[0054]** El PEG y glicerol se calentaron (+70 °C ± 5 °C) y se agitaron para obtener una solución homogénea; después la agitación se detuvo y, una vez que la solución se había enfriado a una temperatura de +60 °C, se añadió el polvo seco. Los tres componentes se mezclaron juntos con una paleta para obtener una pasta homogénea. Al final del proceso, el peso de la TBP fue de 911,4 gramos. La pasta obtenida de este modo se distribuyó en carpoules de 2,5 cm³, 5,0 cm³ y 10,0 cm³.

10 **[0055]** Los carpoules llenos se sellaron después dentro de una bolsa doble y se sometieron a un tratamiento de inactivación viral por medio de reacción gamma.

[0056] Los ensayos biológicos realizados para evaluar la capacidad ósteo-inductora del producto resultante, basándose en el control de marcadores tales como actividad fosfatasa alcalina y la concentración de osteocalcina en cultivos de células madre, confirmaron la no toxicidad y la capacidad ósteo-inductora de la pasta. La actividad de fosfatasa alcalina, medida en muestras en diversas etapas del proceso de producción de la pasta, demostró que la capacidad osteogénica del producto final no es significativamente inferior a la del producto original en la línea de base, como se confirma por el extracto de los resultados proporcionado a continuación.

Ensayo de fosfatasa alcalina

[0057]

MUESTRA (15 g)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (Unidad/mg de proteína)
Control positivo	681
Polvo	722
Polvo desmineralizado	625
Polvo desmineralizado irradiado con gamma	584
TBP irradiada con gamma	801

20

[0058] También se ensayó osteocalcina (un marcador de osificación y en consecuencia de osteogénesis), confirmando los resultados obtenidos para la actividad fosfatasa alcalina; de hecho, no fue detectable una reducción significativa en el potencial ósteo-inductor del producto durante el proceso de producción de pasta:

Ensayo de osteocalcina

25 **[0059]**

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/mg de proteína)
Control positivo	31,0
Polvo	22,7
Polvo desmineralizado	16,1
Polvo desmineralizado irradiado con gamma	17,5
TBP irradiada con gamma	16,8

REIVINDICACIONES

5 **1.** Una pasta ósea humana, esterilizada e inactivada para virus por medio de radiación gamma, que comprende: hueso cortical desmineralizado homólogo de origen humano en forma de polvo que tiene una distribución de tamaño de partícula comprendida entre 125 µm y 850 µm, con glicerol y PEG 4000; teniendo dicha pasta la siguiente composición en porcentaje:

Polvo de hueso	20 %/-40 %
PEG	25 %/-45 %
Glicerol	25 %/-45 %;

en la que dicho polvo de hueso desmineralizado tiene un contenido de calcio de menos de 5 % en peso y dicho PEG es PEG4000.

2. Una pasta de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene la siguiente composición en porcentaje:

Polvo de hueso	30 %
PEG	35 %
Glicerol	35 %

3. Un proceso para la preparación de una pasta de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que:

- 10 - se obtiene un polvo de hueso a partir de tejido óseo cortical seco por medio de un proceso de pulverización del tejido en una máquina de molienda de hueso y posterior selección para obtener una distribución de tamaño de partícula comprendida entre 125 µm y 850 µm;
- el polvo se desmineraliza, se lava con un tampón fosfato y agua purificada y después se seca;
- 15 - el polvo resultante se añade a una solución de glicerol y PEG 4000, mezclando para obtener una pasta homogénea que se enfría y después se distribuye en carpoules que se sellan en vacío en una bolsa doble de aluminio/polipropileno y se somete a una esterilización de rayos gamma y tratamiento de inactivación de virus.

en el que dicha desmineralización se consigue en las siguientes etapas:

- 20 - el polvo seco obtenido en las primeras etapas del proceso se somete a 4 ciclos de lavado con HCl 0,6 N, en proporciones de 1:8, dejando el ácido en contacto con el polvo durante 15 minutos en el primer lavado, 30 minutos en el segundo y 2 horas en el tercero y el cuarto;
- el polvo se lava después dos veces con agua purificada en proporciones de 1:10; durando cada ciclo de lavado 15 minutos;

25 en el que la solución de glicerol y PEG se obtiene mezclando los dos componentes a aproximadamente 70 °C mientras se agita para obtener una solución homogénea que después se deja enfriar a aproximadamente 60 °C antes de añadir el polvo desmineralizado.

4. La pasta de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en procedimientos de reparación y de reconstrucción de hueso.