

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 725**

21 Número de solicitud: **201031896**

51 Int. Cl.:

**A61L 2/04** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**A61F 2/28** (2006.01)

**A61L 27/36** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **21.12.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**13.12.2012**

71 Solicitante/s:

**Luis Antonio GARCIA RODRIGUEZ (50.0%)  
Fornos, 5  
15177 SERANTES-OLEIROS, A Coruña, ES y  
Olvido FERNÁNDEZ MALLO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GARCIA RODRIGUEZ, Luis Antonio y  
FERNÁNDEZ MALLO, Olvido**

74 Agente/Representante:

**DOMÍNGUEZ COBETA, Josefa**

54 Título: **MÉTODO PARA EL PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ÓSEO ALOGÉNICO Y RECIPIENTE PARA LLEVARLO A CABO**

57 Resumen:

**Método para el procesamiento del tejido óseo alogénico, y recipiente para llevarlo a cabo, que comprende los siguientes cuatro procedimientos de aplicación sucesiva:**

**- Lavado individualizado de cada aloinjerto óseo en recipiente hermético y sumergido en suero fisiológico a 60°C durante 10 minutos y seguido 1 minuto de agitación manual enérgica.**

**- Centrifugación individualizada de cada aloinjerto, a 2.000 revoluciones por minuto durante 15 minutos para 1500 g. en recipiente específico de PVC.**

**- Pasteurización individualizada de cada aloinjerto durante 90 minutos en recipiente estéril hermético con suero fisiológico precalentado a 60°C.**

**- Control microbiológico final, pesando el suero de la pasteurización a través de filtro de papel con tamaño de poro de 0,45 µm, y cultivando dicho filtro en medio de cultivo para microorganismos aerobios, anaerobios y hongos.**

ES 2 392 725 A1

## DESCRIPCIÓN

Método para el procesamiento del tejido óseo alogénico y recipiente para llevarlo a cabo.

### OBJETO DE LA INVENCION

5 La invención, tal como expresa el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere a un método para el procesamiento del tejido óseo alogénico y a un recipiente para llevarlo a cabo.

10 Más en particular, el objeto de la invención se centra en el desarrollo de una nueva metodología de procesamiento para aloinjertos óseos, que reúne las características de sencillez, eficacia, efectividad y eficiencia, permitiendo obtener aloinjertos de mayor calidad biológica que los obtenidos con otros métodos de procesamiento, suponiendo, por tanto, una mejorada alternativa a lo ya conocido en este campo. Además, la invención comprende un segundo aspecto relativo a un recipiente específico adaptado para llevar a cabo una de las etapas del procedimiento.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Como es sabido, llamamos Injerto Osteotendinoso a cualquier material biológico compuesto por tejido óseo, tendinoso o combinación de ambos, extraído de su emplazamiento original para ser utilizado en un lugar distinto de este.

Los aloinjertos osteotendinosos son portadores de elementos celulares y humorales susceptibles de producir una reacción inmunitaria huésped contra injerto en el receptor.

20 El contenido celular del injerto (células del tejido óseo, células del estroma tisular, precursores hematopoyéticos, vasos y nervios) sufre fenómenos de necrosis isquémica desde el momento de su extracción (autoinjertos) o desde el momento del fallecimiento del donante (aloinjertos); la duración de la isquemia y su carácter de fría o caliente determina cambios irreversibles en el interior del injerto en una doble vertiente: por una parte se produce deterioro de la matriz orgánica e inactivación de factores humorales osteoinductores (BMPs, citoquinas de la familia de los TGF tipo  $\beta$ , relacionados con el contenido colágeno de la matriz), por otra parte los fenómenos de necrosis favorecen la contaminación de los injertos.

25 Ambos fenómenos deben ser evitados para garantizar la calidad de los injertos. Se pueden producir, además, reacciones de hidrólisis y oxidación como la peroxidación lipídica.

30 Todos estos fenómenos altamente nocivos para la calidad e incluso la supervivencia del injerto necesitan de la presencia de "agua libre" <sup>(15, 33)</sup> en el interior del tejido. De hecho, la inmovilización del agua libre es uno de los principales objetivos que debe cumplir la preservación de los aloinjertos osteotendinosos, la cual puede conseguirse a través de varias vías:

- Ultracongelación: Por debajo de  $-80^{\circ}$  no existe agua libre en el estroma tisular (las moléculas de H<sub>2</sub>O están inmovilizadas en forma de cristales de hielo), además del efecto de destrucción celular que produce la congelación rápida. La ultracongelación <sup>(20, 26, 28, 29, 34, 41)</sup> es, por tanto, un excelente medio de preservación de injertos osteotendinosos.

35 - Liofilización <sup>(17)</sup>: Aplicación de un procedimiento de congelación-deshidratación (sublimación del contenido en agua desde partículas de hielo sólido a vapor de agua). La deshidratación desde la fase de hielo sólido previene también la desnaturalización proteica que puede producirse durante el proceso de congelación aislado.

40 - El tercer método para inmovilizar el agua libre es la inmersión en fluidos con muy elevada concentración de solutos. La salazón de determinados alimentos como método de conservación por periodos prolongados conseguía precisamente la inmovilización del agua libre, impidiendo o retardando los fenómenos de putrefacción. En el caso de los tejidos para uso en la clínica se emplea en ocasiones el glicerol a determinada concentración, en especial para la piel y para la obtención de matriz ósea desmineralizada <sup>(27, 33)</sup>.

45 La incorporación de los aloinjertos osteotendinosos se consigue a través de mecanismos de osteoconducción y osteoinducción. Los aloinjertos no son osteoformadores directos de tejido óseo. Por tanto, todo aquello que mejore aquellos dos mecanismos será beneficioso para el resultado final.

El tejido óseo alogénico está compuesto por la matriz ósea, las células propias del tejido óseo (osteoblastos/osteocitos y osteoclastos), tejido hematopoyético, médula ósea grasa, vasos y nervios, todos ellos incluidos en la red tridimensional de sales cálcicas que constituye el soporte físico del tejido óseo.

Atendiendo a las propiedades biológicas óptimas de un aloinjerto osteotendinoso, es vital la

preservación de la matriz ósea, tanto su fracción orgánica como inorgánica. El resto de componentes del tejido carece de propiedades beneficiosas y podría, o debería, ser eliminado.

5 Desde el punto de vista de los fenómenos de osteoinducción, lo más importante es la preservación de la matriz ósea, compuesta por fibras colágenas y otras proteínas (proteínas de adhesión celular, osteocalcina, BMPs, etc.).

Gracias al conjunto de las dos fases de la matriz ósea, orgánica e inorgánica, el tejido óseo posee sus propiedades mecánicas características, combinando dos propiedades aparentemente contradictorias como son rigidez y elasticidad.

10 Las fibras colágenas flexibilidad y resistencia a la flexión, torsión y tensión. La matriz mineralizada le confiere resistencia a la compresión y la dureza necesaria para servir de soporte al conjunto del organismo.

Desde el punto de vista de los fenómenos de osteoconducción, lo importante es mantener intacta la matriz ósea mineralizada, esto es, la estructura física del tejido óseo.

Existe evidencia de que la eliminación de ciertos componentes de la matriz orgánica de los aloinjertos mejora sus propiedades biológicas:

15 - La eliminación del contenido en lípidos, material abundante especialmente en áreas metafisodifisarias, mejora la incorporación de los aloinjertos. Estudios en animal de experimentación comparando el comportamiento biológico de aloinjertos con y sin eliminación de los lípidos, demostraron que los sometidos a eliminación del contenido en lípidos <sup>(4, 17, 26, 39, 40, 44)</sup> mediante cloroformo-metanol mostraron:

- Mejor incorporación.

20 - Histomorfometría: Mayor formación y reabsorción ósea.

-Gammagrafía a las 3 semanas del implante: captación del isótopo por parte del injerto (mayor tasa de remodelación ósea).

- Conservación de las propiedades mecánicas.

25 - La presencia de grasa en el interior de los aloinjertos puede dificultar determinadas aplicaciones clínicas: la impactación de fragmentos de tejido esponjoso para relleno de cavidades, durante la cirugía de recambio protésico de cadera, se facilita si los fragmentos han sido lavados para eliminar el contenido graso. En caso contrario, al ser la grasa un líquido incompresible, los esfuerzos mecánicos para la impactación serán menos eficaces <sup>(7)</sup> y persistirá cierta tendencia al deslizamiento por el efecto lubricante de la propia grasa.

30 - La eliminación del contenido en proteínas libres disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades vehiculadas por priones <sup>(5,8, 10, 11, 13, 18, 19, 25, 31, 38, 42, 43)</sup>.

35 - La reducción del contenido celular disminuye la capacidad inmunogénica de los aloinjertos y reduce la posibilidad de transmisión de patógenos intracelulares: el tejido óseo no procesado puede ser vehículo de transmisión de patógenos, incluyendo HIV, HVC y HTLV. Debemos tener en cuenta, además, que los tests de que disponemos son capaces de detectar los patógenos conocidos a día de hoy, pero en cualquier momento podrían aparecer otros nuevos, intra o extracelulares, no detectables hasta el conocimiento de la enfermedad que transmitan y se desarrollen los tests de detección fiables, algo parecido a lo que ocurrió con el VIH durante los primeros años de la década de los 80 <sup>(9)</sup>.

Por otra parte, la aplicación de bajas dosis de calor (hasta 60° C y hasta 10 horas) destruye bacterias y virus patógenos sin alterar las propiedades mecánicas ni la efectividad clínica <sup>(3, 6, 12, 16, 21, 24, 30, 32, 35-37)</sup>.

40 La revisión exhaustiva de la bibliografía acerca de las tendencias actuales en cuanto a procesamiento de aloinjertos osteotendinosos, en particular los trabajos de Lomas <sup>(26)</sup>, Galea <sup>(17)</sup> y Yates <sup>(44)</sup>, permitieron atisbar un nuevo diseño en este campo de actividad donde, como ya se ha mencionado con anterioridad, existen unas normas básicas de obligado cumplimiento (normativa legal), pero también un amplio margen de posibilidades de mejora biológica y microbiológica de los aloinjertos para uso clínico.

45 Teniendo en cuenta la evidencia científica actual que indica la conveniencia de eliminar ciertos componentes de la matriz orgánica, parece igualmente evidente la necesidad de desarrollar la metodología necesaria para conseguir dicha mejoría biológica sin que la manipulación añadida traiga como consecuencia un incremento de la contaminación. La consecución de este equilibrio no es fácil, pero la investigación científica en este campo debe avanzar en esa línea:

- 1 - Eliminar en lo posible el contenido en lípidos del interior de los aloinjertos.
- 2 - Eliminar en lo posible el contenido en proteínas libres del interior de los aloinjertos.
- 3 - Eliminar el contenido celular del interior de los injertos.
- 4 - Conservar la fracción proteica con capacidades osteoinductoras.

5 5 - Conservar la estructura mineral tridimensional del tejido óseo.  
6 - Conseguir, al final del procedimiento, un tejido libre de microorganismos transmisibles al receptor.

10 En la práctica es difícil o imposible establecer unos estándares en cuanto al contenido tisular y celular de un segmento óseo, dada la variabilidad existente no sólo entre distintos individuos sino incluso entre distintos fragmentos óseos de un mismo individuo.

15 Por otra parte, la propia estructura física de cada segmento tiene mucho que ver en la facilidad o dificultad del proceso: los aloinjertos de hueso esponjoso de estructura más abierta como los cuerpos vertebrales, facilitan la eliminación del contenido humoral y celular de modo rápido y sencillo, muy distinto de otros huesos, también de predominio esponjoso pero mucho más denso, como el que compone un cóndilo femoral.

15 Por este motivo el objetivo de la presente invención es desarrollar un nuevo método de procesamiento para aloinjertos óseos, buscando que sea suficientemente eficaz y rápido para ser aplicado de manera inmediata, así como suficientemente seguro desde el punto de vista microbiológico como para asegurar la no transmisión de enfermedad. En definitiva, un método que cumpla los siguientes requerimientos:

- 20 naturaleza.
- Seguro desde el punto de vista de la transmisión de enfermedades infecciosas o de otra naturaleza.
  - Efectivo desde el punto de vista biológico.
  - Reproducible.
  - Superior a otros métodos conocidos.
  - Eficiente desde el punto de vista de la relación coste/beneficio clínico.

25 Por otra parte y como referencia al estado de la técnica, debe señalarse que el solicitante desconoce la existencia de ningún otro método o procedimiento de aplicación similar que presente unas características semejantes a las que presenta el que aquí se preconiza, estando los detalles caracterizadores del mismo convenientemente recogidos en las reivindicaciones finales que acompañan a la presente memoria descriptiva.

### 30 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

35 Así, pues, la invención tiene como objetivo desarrollar una metodología de procesamiento para tejido osteotendinoso alogénico, que permita la eliminación del material hemático (sangre y médula ósea), proteico y lipídico del tejido osteotendinoso en la mayor cantidad que sea posible. Ello debe lograrse sin que suponga prolongar y/o complicar la técnica hasta el punto de hacerla inviable para la práctica clínica, bien sea por su excesiva prolongación en el tiempo, bien porque los cambios propuestos incrementen el riesgo de contaminación microbiológica de los aloinjertos.

La eliminación de estos elementos, considerados nocivos para el comportamiento biológico de los injertos, se puede realizar por diversos procedimientos, desde la aplicación de solventes químicos a la utilización de sistemas mecánicos de movilización de células y componentes lipídicos y proteicos.

40 Después de revisar las distintas líneas de investigación conocidas, se opta por el empleo de métodos físicos de limpieza de los injertos, basándose en las experiencias de los investigadores anglosajones, y consiste esencialmente en aplicar al tejido osteotendinoso los siguientes procedimientos, en la secuencia que se indica:

1. Lavado bajo agitación energética en incubadora orbital a 60° C.
2. Centrifugación.

45

3. Pasteurización.

Esta metodología simplifica sensiblemente el procedimiento diseñado por los autores anglosajones y lo acorta en el tiempo, de modo que es perfectamente aplicable a las condiciones reales de trabajo de los bancos de tejidos de nuestro entorno.

5 Además, no requiere medios tecnológicos sofisticados ni, por tanto, entrenamiento específico por parte del personal que ya trabaja en las unidades de procesamiento de tejidos alogénicos, por lo que podría ser aplicado a la práctica de manera casi inmediata.

10 De forma concreta, el método para el procesamiento del tejido óseo alogénico que se expone a continuación, objeto de la presente invención como método original, responde al interés de obtener injertos óseos de mayor calidad biológica que los obtenidos con otros métodos de procesamiento, eliminando de su interior la mayor cantidad posible de lípidos, proteínas solubles y células, consiguiendo una mejor y más rápida incorporación tras su implante en el paciente receptor, junto a una menor reacción inmunitaria de éste frente al injerto y una menor probabilidad de transmisión de enfermedades vehiculadas por los aloinjertos óseos.

15 Para ello el método propuesto consiste en cuatro procedimientos o fases de aplicación sucesiva consistentes en:

Primero.- Lavado de cada aloinjerto de manera individualizada, en recipiente hermético y sumergido en suero fisiológico a 60° centígrados de temperatura, en condiciones de esterilidad.

La duración de este primer procedimiento es de 10 minutos, e irá seguido de agitación manual enérgica durante 1 minuto en el mismo recipiente hermético de lavado.

20 Segundo.- Centrifugación de cada aloinjerto óseo de manera individualizada, manteniendo las condiciones de esterilidad, a 2.000 revoluciones por minuto (1.500 g) en centrifugadora de laboratorio (HERAEUS CRYOFUGE 8.000), durante 15 minutos.

25 Debe señalarse que la citada centrifugación se realiza en el interior de un recipiente diseñado y construido específicamente para este procedimiento en PVC resistente a autoclave, con rejilla en su parte inferior para permitir la salida de los materiales a eliminar y mantenerlos separados del aloinjerto durante la centrifugación.

Dicho recipiente tendrá las medidas adaptadas a cada centrifugadora siendo, preferentemente, las siguientes medidas interiores y exteriores:

MEDIDAS EXTERIORES.-

Altura: 120 milímetros.

30 Anchura: 99 milímetros.

Rosca de cierre: 6 espiras con paso de rosca de 5 milímetros.

MEDIDAS INTERIORES.-

Profundidad: 97 milímetros (con rejilla colocada: 82 milímetros).

Anchura: 76 milímetros.

35 MEDIDAS DE LA REJILLA.-

Altura: 15 milímetros.

Anchura: 74,5 milímetros.

Diámetro de los orificios: 6 milímetros.

40 Tercero.- Pasteurización de cada aloinjerto óseo de manera individualizada. Este procedimiento tiene por finalidad la destrucción mediante calor de bacteria, hongos y virus patógenos.

Cada aloinjerto se introduce en un recipiente estéril de cierre hermético, con código de identificación individual para cada aloinjerto, añadiendo suero fisiológico precalentado a 60° centígrados hasta cubrir por completo el injerto óseo.

Los recipientes, en grupos de cuatro, se introducen en la termoagitadora de laboratorio (SELECTA

UNITRONIC 320 OR), con control de temperatura y velocidad de agitación, programándose el procedimiento a 60° centígrados durante 90 minutos a una velocidad de agitación orbital de 40 ciclos por minuto.

Cuarto y último.- Control microbiológico final. Tras la fase de pasteurización se procede al control microbiológico que completa el proceso.

5 Para ello, bajo campana de flujo laminar para mantener en todo momento las condiciones de esterilidad, se hace pasar el suero en el que se realizó la pasteurización a través de un filtro de papel con tamaño de poro de 0,45 µm, cultivando directamente el filtro en medio de cultivo para microorganismos aerobios, anaerobios y hongos.

10 Visto lo que antecede, se constata que el nuevo método que la invención propone reúne las características de efectividad, eficiencia y sencillez de aplicación, mejorando significativamente los métodos tradicionales para el procesamiento de esta clase de tejidos humanos.

La nueva metodología presenta una elevada efectividad para la reducción del contenido humoral y celular de los injertos, mejorando su capacidad de integración por parte del receptor y disminuyendo la probabilidad de transmisión de enfermedades vehiculadas por agentes patógenos intracelulares.

15 Por otra parte la aplicación y utilización de la nueva metodología de procesamiento es sencilla y rápida, pudiendo ser fácilmente incorporada por cualquier banco de tejido osteotendinoso. Sus tiempos de aplicación son perfectamente compatibles con el horario laboral habitual de este tipo de unidades.

20 Los procedimientos de lavado/agitación (10 minutos a 60° C) y centrifugación (1500 g durante 15 minutos), muy efectivos para la eliminación del contenido humoral y celular de los aloinjertos, presentan escasa efectividad antiséptica. Sin embargo, la fase de pasteurización (90 minutos a 60° C), incluida como procedimiento final de la nueva metodología, proporciona, según nuestros estudios, un 100% de eficacia bactericida y fungicida.

El procedimiento de pasteurización como método descontaminante, asociado al filtrado final como método de detección de injertos contaminados, configuran la nueva metodología de procesamiento como un proceso de elevada seguridad microbiológica.

25 Debe mencionarse que se ha realizado un estudio comparativo de resultados entre la metodología tradicional de procesamiento y la nueva metodología aquí presentada. Este estudio se ha llevado a cabo en las condiciones reales de la práctica diaria de un banco de tejidos, con una muestra suficientemente amplia (n= 693). En estas condiciones, la tasa de contaminación observada para los injertos procesados con la nueva metodología ha sido significativamente inferior a la de la metodología tradicional: 2,08 % frente a 7,84 % de esta última.

30 Por último, hay que mencionar que la relación coste/efectividad de la nueva metodología es significativamente mejor que la de la metodología tradicional. La nueva metodología permitiría un ahorro superior a 108.000 euros para un periodo de 10 años, a expensas de una importante reducción en las tasas de contaminación de los aloinjertos.

35 Esto representa un mayor número de injertos disponibles para su utilización clínica, lo que compensaría sobradamente la inversión en equipamiento necesaria para su puesta en marcha, así como el incremento de costes derivado de la mayor complejidad del procedimiento.

40 Se constata, por consiguiente, que el descrito método para el procesamiento del tejido óseo alogénico representa, una innovación de características estructurales y constitutivas desconocidas hasta ahora para tal fin, razones que unidas a su utilidad práctica, la dotan de fundamento suficiente para obtener el privilegio de exclusividad que se solicita.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. AMERICAN ASSOCIATION OF TISSUE BANKS. GUIDANCE DOCUMENT. Prevention of contamination and cross-contamination at recovery: practices & culture results 2004.
2. AMERICAN ASSOCIATION OF TISSUE BANKS. GUIDANCE DOCUMENT. Current good tissue practice 2006; N° 3.
3. Araya V, Gallo L, Quesada C et al. Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuidos en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica. ALAN 2008; vol.58, nº 2: 182-6.
4. Spenberg P, Thoren K. Lipid extraction enhances bank bone incorporation. Act Orthop Scand 1990; 61: 546-8.

5. Bateman D, Hilton D, Love S, Zeidel M, Beck J, Collinge J. Sporadic CJD in a 18-year-old in the UK. *Lancet* 1995; 346: 1155.
6. Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes WC. Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* 1995; 16: 545–51.
- 5 7. Brewster NT, Gillespie WJ, Howie CR, Madabhushi SP, Usami AS, Fairbairn DR. Mechanical considerations in impaction bone grafting. *J Bone Joint Sur* 1999; 81-B: 118–24.
8. Britton TC, Sarraj SA, Shaw C, Campbell T, Collinge J. Sporadic CJD in a 16-year-old in the UK. *Lancet* 1995; 346: 1155.
- 10 9. CDC Case Report and Public Health Recommendations: "Transmission of HIV through Bone Transplantation". *J Am Med Assoc* 1988; 260: 2487.
10. Chazot G, Brousolle E, Lapras CL, Blattler T, Aguzzi A, Kopp N. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old french man. *Lancet* 1996; 347: 1181.
11. Comisión Europea. Nombre de cas d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine.
- 15 12. Draenert GF, Delius M. The mechanically stable steam sterilization of bone grafts. *Biomaterials* 2007; 28(8):1531-8.
13. Escudero Torrella J. Cronología de la Nueva Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Conferencia en el Primer Congreso Virtual Iberoamericano de Neurología.
14. Estándares de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT). 3ª edición, 2008.
- 20 15. Fontana AJ. Dew-point method for the determination of water activity. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 2001.
16. Freiberg A, Saltzman C, Smith W. Replantation of an autoclaved, autogenous humerus in a patient with chondrosarcoma. *J Bone Joint Surg* 1992; 74A: 438–9.
17. Galea G, Kearney JN. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. *Transfusion Medicine* 2005; 15: 165–74.
- 25 18. Haltia M. Human prion diseases. *Ann Med* 2000; 32: 493-500.
19. Heras Pérez JA. Nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob: primer caso diagnosticado en España. Conferencia en el Primer Congreso Virtual Iberoamericano de Neurología.
20. Heyligers IC, Klein-Nulend J. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank* 2005; 6(1): 25-31.
- 30 21. Knaepler H, Haas H, Puschel HU. Biomechanical properties of heat and radiation application to bone. *Unfall-Chirurgie* 1990; 17: 194–9.
22. Komender R, Komender A, Dziedzic-Goclavska A, Ostrowski K. Radiation-sterilized bone grafts evaluated by electron spin resonance technique and mechanical tests. *Transplant Proc* 1976; 8 (Suppl. 1): 25–37.
- 35 23. Komender J, Malczewska H, Komender A. Preserved, allogeneic bone grafts in orthopaedic reconstructions. *Orthop Allograft Surg* 1996; 39–44.
24. Kreicbergs A, Kohler P. Bone exposed to heat. *Bonetransplant* 1989; 154–161.
25. Lemstra AW, van Meegen MT, Vreyling JP, et al. Testing in diagnosing Creutzfeldt-Jacob disease: A prospective study in 112 patients. *Neurology* 2000; 55: 514-616.
- 40 26. Lomas R, Drummond O, Kearney JN. Processing of whole femoral head allografts: a method for improving clinical efficacy and safety. *Cell and Tissue Banking* 2000; 1: 193–200.
27. Lomas RJ, Cruse-Sawyer JE, Simpson C, Ingham E, Bojar R, Kearney JN. Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol. *Burns* 2003; 29: 515–25.
28. Paulos L et al. Comparative material properties of allograft tissues for ligament replacement: effects of type, age,

- sterilisation and preservation. *Trans Orthop Res Soc* 1987; 12: 129.
29. Pegg DE. The preservation of tissues for transplantation. *Cell Tissue Bank* 2006; 7(4): 349-58.
30. Pettersson M, Baath E. Temperature-dependent changes in the soil bacteria community in limed and unlimed soil. *Microbiology Ecology* 2003; 45: 13-21.
- 5 31. Polo JM. Historia y clasificación de enfermedades por priones en humanos. *Rev Neurol* 2000; 31: 137-41.
32. Pruss A, Seibold M, Benedix F, Frommelt L, Von Garrel T, Gürtler L et al. Validation of the 'Marburg bone bank system' for thermoinfection of allogeneic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores. *Biol* 2003; 31: 287-94.
- 10 33. Ross A, Kearney JN. The measurement of water activity in allogeneic skin grafts preserved using high concentration glycerol or propylene glycol. *Cell Tissue Bank* 2004; 5 (1): 37-44.
34. Salai M, Brosh T, Keller N, Perelman M, Dudkiewitz I. The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: a microbiological, histological and mechanical study. *Cell Tissue Bank* 2000; 1(1): 69-73.
- 15 35. Sharkey N, Hollstein S, Martin R. Thermal inactivation of HIV in cadaveric specimens: Biomechanical effects on bone. *Proceedings of the Orthopaedic Res Society* 1991: 279.
36. Shimizu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shin S. Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999; 119(1-2): 57-61.
37. Shin S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shimizu K, Kaku N et al. Biomechanical properties of heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005; 125(1): 1-5.
- 20 38. The European and Allied Countries Collaborative Study Group of CJD (EuroCJD).
39. Thoren K, Aspenberg P. Increased bone ingrowth distance into lipid-extracted bank bone at 6 weeks. A titanium chamber study in allogeneic and syngeneic rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995; 114(3): 167-71.
40. Thoren K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone: bone conductive and mechanical properties. *Clin Orthop Rel Res* 1995; 311: 232-46.
- 25 41. Van P, Thevelein J. Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance and biotechnological applications. *Adv Appl Microbiol* 2003; 53: 129.
42. Will RG, Ironside JW, Zeidler M et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921-25.
- 30 43. World Health Organisation. Report of a WHO consultation on clinical and neuropathological characteristics of the new variant of CJD and other human and animal transmissible spongiform encephalopathies. WHO 1996.
44. Yates P, Thomson J, Galea G. Processing of whole femoral head allografts: Validation methodology for the reliable removal of nucleated cells, lipid and soluble proteins using a multi-step washing procedure. *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 277-85.



**REIVINDICACIONES**

1.- MÉTODO PARA EL PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ÓSEO ALOGÉNICO, **caracterizado** porque comprende cuatro procedimientos o fases de aplicación sucesiva consistentes en:

- 5 - Lavado de cada aloinjerto de manera individualizada, en recipiente hermético y sumergido en suero fisiológico a 60° centígrados de temperatura, en condiciones de esterilidad, con una duración de 10 minutos, y seguido de agitación manual enérgica durante 1 minuto en el mismo recipiente hermético de lavado.
- Centrifugación de cada aloinjerto óseo de manera individualizada, manteniendo las condiciones de esterilidad, a 2.000 revoluciones por minuto (1.500 g) en centrifugadora de laboratorio durante 15 minutos.
- 10 - Pasteurización de cada aloinjerto óseo de manera individualizada, con la finalidad de destruir mediante calor hongos y bacterias patógenas, para lo cual se introduce en un recipiente estéril de cierre hermético, con código de identificación individual para cada aloinjerto, añadiendo suero fisiológico precalentado a 60° centígrados hasta cubrir por completo el injerto óseo, agitándose durante 90 minutos.
- 15 - Control microbiológico final, para lo cual, bajo campana de flujo laminar con condiciones de esterilidad, se hace pasar el suero en el que se realizó la pasteurización a través de un filtro de papel con tamaño de poro de 0,45 µm, cultivando directamente el filtro en medio de cultivo para microorganismos aerobios, anaerobios y hongos.

2.- MÉTODO PARA EL PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ÓSEO ALOGÉNICO, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la fase de pasteurización, los recipientes se introducen en grupos de cuatro en una termoagitadora de laboratorio con control de temperatura y velocidad de agitación, programándose el procedimiento a 60° centígrados y a una velocidad de agitación orbital de 40 ciclos por minuto.

25 3.- RECIPIENTE para llevar a cabo un método para el procesamiento del tejido óseo alogénico como el descrito en la reivindicación 1 ó 2, concretamente para llevar a cabo la etapa de centrifugación comprendida en dicho método, **caracterizado** porque consiste en un recipiente diseñado y construido específicamente para este procedimiento en PVC resistente a autoclave, con rejilla en su parte inferior para permitir la salida de los materiales a eliminar y mantenerlos separados del aloinjerto durante la centrifugación.

4.- RECIPIENTE, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dicho recipiente tiene las siguientes dimensiones:

MEDIDAS EXTERIORES.-

- 30 Altura: 120 milímetros.  
Anchura: 99 milímetros.  
Rosca de cierre: 6 espiras con paso de rosca de 5 milímetros.

MEDIDAS INTERIORES.-

- Profundidad: 97 milímetros (con rejilla colocada: 82 milímetros).  
Anchura: 76 milímetros.

35 MEDIDAS DE LA REJILLA.-

- Altura: 15 milímetros.  
Anchura: 74,5 milímetros.  
Diámetro de los orificios: 6 milímetros.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031896

②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA RODRÍGUEZ, LA. Proyecto de procesamiento mejorado para aloinjertos osteotendinosos. Desarrollo y validación de una nueva metodología de procesamiento para tejido osteotendinoso alogénico. <i>Tesis doctoral</i> [on line], 29-06-2010 [recuperado el 26-11-2012]. Recuperado de internet: <URL: <a href="http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/7325">http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/7325</a> >; <URL: <a href="https://www.educacion.gob.es/teseo/createpdf?origen=3&amp;idFicha=295853">https://www.educacion.gob.es/teseo/createpdf?origen=3&amp;idFicha=295853</a> >, especialmente páginas 77-80, 87, 89, 94-98, 102, 215, 239.	1-4
A	EP 1700582 A2 (ALLOGRAFT TISSUE SYSTEMS INC ) 13/09/2006, todo el documento	1-4
A	US 2004219058 A1 ( SHIMP LAWRENCE A ET AL.) 04/11/2004, todo el documento	1-4
A	US 5977432 A (WOLFINBARGER JR LLOYD ET AL.) 02/11/1999, todo el documento	1-4

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
27.11.2012

Examinador  
J. Collado Martínez

Página  
1/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61L2/04** (2006.01)

**B01L3/00** (2006.01)

A61F2/28 (2006.01)

A61L27/36 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, B01L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS, GOOGLE ACADEMICO

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1,2,4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 3	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCÍA RODRÍGUEZ, LA. <i>Tesis doctoral</i> [on line], 29-06-2010 [recuperado el 26-11-2012]. Reuperado de internet: <URL: <a href="http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/7325">http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/7325</a> >,<URL: <a href="https://www.educacion.gob.es/teseo/createpdf?origen=3&amp;idFicha=295853">https://www.educacion.gob.es/teseo/createpdf?origen=3&amp;idFicha=295853</a> >,	29-06-2010
D02	EP 1700582 A2	13.09.2006
D03	US 2004219058 A1	04.11.2004
D04	US 5977432 A	02.11.1999

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud tiene por objeto un método de procesamiento del tejido óseo alogénico que comprende las etapas de lavado/agitación, centrifugación, pasteurización y control microbiológico final del material procesado. Asimismo, es objeto de la solicitud un recipiente especialmente diseñado para llevar a cabo la etapa de centrifugación del método de la invención.

El documento D01 divulga el desarrollo de una metodología aplicada al procesamiento de tejido osteotendinoso alogénico que comprende las etapas de lavado/agitación, centrifugación en un recipiente específicamente diseñado para la puesta en práctica del método, pasteurización y control microbiológico del tejido procesado (ver páginas 77-80, 87, 89, 94-98, 102, 215, 239).

El documento D02 se refiere al tratamiento de un injerto osteocondral para su posterior implantación. El núcleo osteocondral se somete a un lavado previo a una etapa de centrifugación. El material centrifugado se trata con una solución que comprende sustancias antisépticas o antibióticos. La centrifugación se lleva a cabo en una cámara que dispone de un compartimento para el injerto comunicado con un receptáculo inferior donde se deposita el material removido, y otro compartimento que contiene una solución a poner en contacto con el injerto (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un método para la inactivación o reducción de organismos patógenos de tejidos como el óseo, que comprende una centrifugación en seco para eliminar material del tejido y facilitar la penetración de un solvente y, al menos, una centrifugación posterior utilizando un fluido que permite inactivar o reducir los organismos patógenos del tejido. Asimismo, D03 incluye un proceso para eliminar lípidos y/o proteínas de las cavidades óseas mediante la centrifugación con lipasas y proteasas y posterior eliminación del material digerido (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un procedimiento para la eliminación de médula ósea de porciones de injerto óseo que combina el lavado/agitación con agua, sales o agentes descontaminantes, o mezclas de los mismos, con procesos de centrifugación y sonicación (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1, LP 11/1986).

1.1.-Reivindicaciones 1-2.

El documento del estado de la técnica que se considera más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1 es D01. Este documento tiene por objeto un método para el procesamiento del tejido óseo alogénico que comprende cuatro etapas sucesivas:

- Lavado de cada aloinjerto de manera individualizada, en recipiente hermético y sumergido en suero fisiológico a 60 °C, en condiciones de esterilidad, con una duración de 10 minutos, y seguido de agitación manual enérgica durante 1 minuto en el mismo recipiente hermético de lavado (D01; páginas 79, 102).
- Centrifugación de cada aloinjerto óseo de manera individualizada, manteniendo las condiciones de esterilidad, a 2.000 revoluciones por minuto (1.500g) en centrifugadora de laboratorio durante 15 minutos (D01; página 80).
- Pasteurización de cada aloinjerto óseo de manera individualizada, para destruir hongos y bacterias patógenas, introduciendo el aloinjerto en un recipiente estéril de cierre hermético, con suero fisiológico a 60 °C hasta cubrir por completo el injerto óseo, durante 90 minutos sin agitación (D01; páginas 94-98).

- Control microbiológico final. Para ello, en campana de flujo laminar, se hace pasar el suero en el que se realizó la pasteurización a través de un filtro de papel de tamaño de poro 0,45 µm, cultivando directamente el filtro en medios para microorganismos aerobios, anaerobios y hongos (D01; páginas 87, 89, 102, 215, 239).

De la comparación entre D01 y la reivindicación 1 de la presente solicitud se desprende que existen diferencias en la etapa de pasteurización. En primer lugar, D01 no divulga explícitamente el uso de un código de identificación individual para cada aloinjerto. Sin embargo, éste es un elemento irrelevante de cara a la apreciación de la novedad ya que el etiquetado de las muestras constituye una práctica habitual de laboratorio y estaría por lo tanto implícito en D01.

Por el contrario, D01 no divulga que el suero fisiológico de la etapa de pasteurización sea precalentado y además excluye explícitamente la agitación de la etapa de pasteurización, constituyendo éstas sendas diferencias con el método de la invención.

En consecuencia, se considera que D01 no divulga de forma idéntica todas las características del método de la reivindicación 1. Por lo tanto, dicha reivindicación 1 y su reivindicación dependiente 2 cumplen el requisito de novedad (art. 6.1, LP 11/1986).

#### 1.2.-Reivindicaciones 3-4.

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 3 es también D01. Dicho documento divulga un recipiente para llevar a cabo la etapa de centrifugación, siendo este recipiente de PVC, resistente al autoclavado y con una rejilla en su parte inferior para permitir la salida de los materiales a eliminar y mantenerlos separados del aloinjerto durante la centrifugación (D01; página 80).

En base a lo anterior, D01 anticipa de forma idéntica todos los elementos del recipiente definido en la reivindicación 3, por lo que el objeto de dicha reivindicación no cumple con el requisito de novedad (art. 6.1, LP 11/1986).

En oposición a lo anterior, no se ha encontrado en D01 una mención explícita a las medidas de los recipientes de centrifugación. Por lo que, el objeto de la reivindicación 4 no está divulgado en D01 y cumple con el requisito de novedad del art. 6.1 de la LP 11/1986.

#### 2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, LP 11/1986).

##### 2.1.-Reivindicaciones 1-2.

Como ya se ha indicado, la diferencia entre D01 y la reivindicación 1 de la presente solicitud estriba en que en D01 no se menciona explícitamente el precalentamiento del suero en la etapa de pasteurización y en que dicha etapa se lleva a cabo sin agitación, mientras que en el método de la invención se precalienta el suero y se aplica agitación durante los 90 minutos de la pasteurización.

En lo que respecta al precalentamiento del suero, se entiende que éste constituiría una alternativa obvia de proceder para un experto en la materia con el fin de asegurarse de que el tiempo real de tratamiento a 60 °C es lo más próximo a 90 minutos y no inferior.

En cuanto a la agitación, se hace notar que el problema técnico a resolver mediante la pasteurización es la eliminación de posibles organismos patógenos de los aloinjertos. Sin embargo, dicho problema es resuelto de forma efectiva mediante la pasteurización sin agitación de D01 (D01; páginas 240-243). Por lo tanto, en ausencia de una indicación en la presente solicitud de la ventaja o efecto técnico aportado por la agitación, la inclusión de ésta en la etapa de pasteurización se considera que constituiría una mera alternativa para el experto en la materia a la vista de D01.

Por otra parte, en la reivindicación 2 se define la introducción de los recipientes en la termoagitadora en grupos de cuatro para la pasteurización, fijándose una velocidad de agitación orbital de 40 ciclos por minuto. Estos elementos no se encuentran divulgados en D01. Sin embargo, D01 sí contempla el uso en la etapa de pasteurización de una termoagitadora como la que se menciona en la página 12, líneas 13-14 de la presente solicitud (D01; página 77), por lo que la colocación particular de los recipientes en grupos de cuatro se considera una simple alternativa procedimental que no supone una contribución al estado de la técnica. En cuanto a la fijación de una velocidad de agitación orbital de 40 ciclos por minuto, ya se ha indicado que la pasteurización con agitación se considera en sí una mera alternativa al método de pasteurización de D01 sin agitación. Así pues, la elección de un parámetro concreto de velocidad orbital tendría, por extensión, la misma consideración de mera alternativa de procedimiento para el experto en la materia.

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 y 2 carece de actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1 de la LP 11/1986.

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 y 2 carece de actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1 de la LP 11/1986.

#### 2.2 Reivindicación 4.

El documento D01 no incluye las medidas de los recipientes de PVC empleados en la etapa de centrifugación. Sin embargo, hace mención a una limitación de tamaño de las muestras de aloinjerto a procesar los cuales se indica que no pueden superar los 10 x 6 x 6 cm. Estas medidas máximas del aloinjerto son perfectamente compatibles con la capacidad de los recipientes de centrifugación de la reivindicación 4, por lo que se considera que las dimensiones definidas en dicha reivindicación constituyen una mera elección de parámetros obvia para un experto en la materia a la vista de lo divulgado en D01.

Por lo tanto, la reivindicación 4 no cumple con el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 de la LP 11/1986.

Los documentos D02-D04 reflejan el estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la apreciación de la novedad y actividad inventiva del objeto de la presente solicitud.