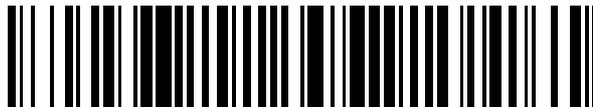


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 838**

51 Int. Cl.:

**A61F 2/28** (2006.01)

**A61F 2/46** (2006.01)

**A61F 2/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2008** **E 08825396 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 2365791**

54 Título: **Procesos y sistemas para la carga de implantes médicos con agentes estimulantes de crecimiento**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.11.2013**

73 Titular/es:

**ALPHATEC SPINE, INC. (100.0%)**  
**5818 El Camino Real**  
**Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**GOVIL, AMIT;**  
**THOMPSON, NEIL IRVIN;**  
**GAMBOA, CHRISTIAN GABRIEL y**  
**SOMASUNDAR, SUDHANSHU**

74 Agente/Representante:

**RODRÍGUEZ ÁLVAREZ, Francisco José**

**ES 2 430 838 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**

Procesos y sistemas para la carga de implantes médicos con agentes estimulantes de crecimiento

**5    Ámbito de la invención**

La presente invención se refiere de manera general a implantes médicos y más concretamente a los métodos y sistemas para hidratar y cargar implantes médicos con componentes biológicos.

10    El injerto de hueso se refiere a una amplia variedad de procedimientos quirúrgicos médicos y dentales en los que es aumentada o estimulada la formación de nuevo hueso en un paciente. El injerto de hueso se utiliza en muchos tipos de procedimientos ortopédicos para tratar fracturas o pérdidas óseas, para reparar el hueso lesionado que no ha mejorado y para fusionar articulaciones con el fin de prevenir el movimiento. Está descrito un ejemplo de un injerto óseo en la US 2007/142916. Con referencia especial a la columna vertebral, los injertos se han utilizado para  
15    estabilizar la columna vertebral y para prevenir el movimiento de segmentos vertebrales seleccionados, que pueden ser una causa significativa de dolor en algunos pacientes. También se han utilizado los injertos para corregir o detener el progreso de la deformidad espinal, tal como escoliosis y para proveer soporte estructural para las fracturas de la espina dorsal.

20    Pueden ser recogidos injertos adecuados procedentes de huesos del cuerpo del propio paciente (autoinjertos), de huesos en miembros de la misma especie (aloinjerto) y de huesos en miembros de otras especies animales (xenoinjerto). Alternativamente, los injertos del hueso pueden crearse utilizando una amplia variedad de materiales naturales y/o sintéticos, tales como el colágeno, polímeros, hidroxiapatita, sulfato de calcio, cerámicas y polímeros biorreabsorbibles, entre muchos otros. Queda entendido que los injertos de hueso pueden incluir aquellos que tienen  
25    una forma predeterminada o que se componen de partículas más pequeñas que pueden moldearse en una forma deseada en el momento de la implantación.

Independientemente de la fuente, los injertos óseos deben ser adecuadamente conservados para la posterior implantación en una instalación quirúrgica. Una práctica habitual consiste en deshidratar los injertos mediante liofilización. Esto no sólo extiende la vida útil de los injertos óseos, sino que también inhibe el crecimiento bacteriano dentro del injerto. Sin embargo, antes de implantar la prótesis en un receptor, el injerto debe ser reconstituido o rehidratado con un líquido adecuado. Esto puede hacerse sumergiendo el injerto de hueso en el líquido. Un ejemplo de un conjunto de sistema de vacío para hidratar y/o rehidratar materiales de injertos ortopédicos se describe en 2005 WO/037136. Sin embargo, el problema con este enfoque, es que la infusión del líquido a través de los poros del injerto es típicamente inaceptablemente lento para un entorno quirúrgico y no garantiza la infusión completa del líquido a través del injerto. Por otra parte, este enfoque aumenta la posibilidad de exponer el injerto a patógenos del medio ambiente.

Otro reto importante en la preparación de injertos para la implantación es el de la carga o siembra uniforme del injerto con los deseados componentes biológicos y células. El desarrollo de equivalentes funcionales de tejido requiere la efectiva y uniforme siembra de componentes biológicos y células en matrices naturales o sintéticas y permitir que se extiendan y desarrollen en la estructura del símil de tejido a partir de las células sembradas. Así, la capacidad para sembrar eficientemente y uniformemente componentes biológicos y células en estructuras tridimensionales sigue siendo un aspecto importante en la ingeniería de tejidos.

**45    Resumen de la Invención**

En este documento se divulgan métodos y sistemas para proporcionar un aparato mejorado y un sistema de empaquetado con el fin de reconstituir e hidratar injertos médicos más rápidamente y para sembrar eficazmente y de manera uniforme los injertos médicos con componentes biológicos y células.

En una realización preferente, se proporciona un contenedor para almacenar una matriz osteoconductiva reabsorbible disponiendo de una matriz absorbente bioabsorbible. De manera general, el contenedor incluye una cavidad interna mantenida bajo presión negativa, una cámara receptora configurada para recibir una solución biológica y una cámara de almacenamiento configurada para almacenar la matriz osteoconductiva reabsorbible. El contenedor tiene también un conjunto de canales que acoplan juntas la cámara de recepción y la cámara de almacenamiento para dispersar la distribución de la solución biológica al mismo tiempo en todo el largo longitudinal de la matriz osteoconductiva reabsorbible una vez que la cámara de recepción recibe la solución biológica.

60    De conformidad con un aspecto de una realización preferente, la matriz del colágeno tiene una densidad de nanofibras de 10 nanofibras por 100 micrones<sup>3</sup> de volumen de matriz de colágeno.

De acuerdo con otro aspecto de otra realización preferente adicional, se proporciona un método de rápida vinculación de un componente biológico a un implante médico antes de la introducción en un individuo. El método puede incluir el proporcionar un contenedor con una cavidad interna mantenida a presión negativa que es configurada para recibir el componente biológico y una cámara de almacenamiento configurada para almacenar un

implante médico. Generalmente, el implante médico incluye una matriz bioabsorbible absorbente y un conjunto de canales que acoplan la cámara receptora a la cámara de almacenamiento y que están configurados para dispersar la distribución del componente biológico, sustancialmente al mismo tiempo, en todo el largo longitudinal del implante médico, una vez que la cámara receptora recibe la solución biológica. Un componente biológico es introducido en la cámara receptora del contenedor.

En algunas realizaciones, la vinculación sustancial es mayor que el 50% de la vinculación de un componente biológico a una matriz absorbente y preferiblemente superior al 75% de la vinculación de un componente biológico a una matriz absorbente.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se mostrarán más evidentes a los expertos de la Técnica gracias a la descripción detallada siguiente.

**Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1A es una vista superior de una realización de un contenedor para un implante médico.

La FIG. 1B es una vista superior del contenedor para un implante médico de la FIG. 1 sin la tapa.

La FIG. 1C es una vista transversal del contenedor para un implante médico de la FIG. 1A tomada a lo largo del eje 1' - 1'

La FIG. 2A es una vista de alzado frontal de otra realización del contenedor para un implante médico.

La FIG. 2B es una vista en perspectiva trasera del contenedor para un implante médico de la FIG. 2A.

La FIG. 3 es una vista superior de una realización adicional del contenedor para un implante médico, junto con una jeringa y aguja.

La FIG. 4A es una vista superior de aun otra realización adicional del contenedor para un implante médico.

La FIG. 4B es una vista superior del contenedor para un implante médico de la FIG. 4A sin la tapa.

La FIG. 5A es una vista superior de otra realización adicional del contenedor para un implante médico.

La FIG. 5B es una vista superior del contenedor para un implante médico de la FIG. 5A mostrando la reconstitución del sustrato utilizando una jeringa.

La FIG. 6 es un gráfico de datos mostrando el esfuerzo relativo de vinculación de rhBMP-2 aplicado a Esponjas Absorbibles de Colágeno (Absorbable Collagen Sponges) (ACS) contenida en un contenedor sellado al vacío (*vacuum sealed package*) (VIP).

La FIG. 7 es un gráfico de datos mostrando el esfuerzo relativo de vinculación de rhBMP-2 aplicado al aloinjerto de tejido óseo contenido en un contenedor sellado al vacío (VIP).

Números similares representan las diversas partes equivalentes a través de las diversas vistas de los dibujos. La invención tal como se reivindica se muestra en la fig.3.

**Descripción detallada de las Realizaciones de la invención**

La presente divulgación está dirigida a sistemas y métodos para reconstituir y hidratar rápidamente injertos médicos y para sembrar uniformemente injertos médicos con componentes biológicos y células. Los métodos y sistemas divulgados en este documento son especialmente adecuados para ambientes quirúrgicos donde se desea la habilidad para preparar rápidamente injertos para su implantación en un paciente. Aunque la presente divulgación describe los métodos y sistemas para la hidratación de injertos médicos, particularmente injertos óseos, se entiende que los métodos y sistemas también pueden ser aplicados en una amplia variedad de aplicaciones médicas y dentales y también en aplicaciones de tejidos blandos, tales como en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos. En consecuencia, el término "injerto" tal como es utilizado en este documento puede estar compuesto de cualquier tejido de origen natural incluyendo tejido óseo y tejidos blandos, así como cualquier sustancia de origen no-naturalmente utilizada como un injerto o cualquier combinación entre éstos.

Las Figs. 1A-C representan diversas vistas de una realización de un sistema de implante médico 100 que pueden ser utilizadas en conexión con los sistemas y métodos divulgados en este documento. Como se muestra en las figuras 1A-C, el sistema de implante médico 100 consta de un contenedor 110 que incluye puerto de entrada 120, una cavidad de aguja 130 y una cavidad para injerto 140 que contiene un implante médico, tales como un injerto óseo deshidratado (no mostrado). Como se muestra en la figura 1A, una jeringa con aguja puede ser insertada a

través del puerto de entrada 120 para suministrar líquidos, componentes biológicos y/o células en la cavidad de aguja 130 y al injerto que se almacena en la cavidad de injerto 140 del contenedor 110. La cavidad de aguja 130 está situada adyacente a la cavidad del injerto 140 para recibir la jeringa con aguja y los líquidos, componentes biológicos y/o células.

5 Es deseable mantener el contenedor entero 110 bajo presión negativa y, más preferentemente, bajo un vacío importante. Esto es debido a que los implantes médicos, tales como los injertos óseos, están comúnmente deshidratados y liofilizados para almacenamiento antes de ser utilizados o implantados. Cuanto mayor sea la presión negativa o el vacío dentro del contenedor, mayor será la evacuación de los poros dentro del injerto y, por lo tanto, también mayor la infusión de la solución hidratante dentro del injerto. Por lo tanto, es preferible tener una presión absoluta dentro del contenedor tan cercana a 0 mbar como sea posible. En una realización preferente, la presión absoluta en el interior del contenedor es menor de 100 mbar, más preferiblemente 10 mbar y lo más preferible 1-5 mbar.

15 La liofilización implica un proceso de congelación bajo presión negativa que da como resultado un injerto de baja humedad residual. Una de las ventajas de este proceso es que permite el almacenamiento de los injertos óseos y otro material biológico a temperatura ambiente. También proporciona un aumento de la vida útil con cambios bioquímicos reducidos en el injerto de hueso. Por ello, los injertos liofilizados ofrecen la ventaja de proporcionar un almacenamiento fácil y económico antes de su utilización.

20 Además, es preferible reducir, si no eliminar completamente, cualquier humedad residual dentro del injerto antes de introducirlo en el contenedor. Ello es debido a que la presión negativa o el vacío en el contenedor pueden causar que la humedad residual se vaporice, lo que, a su vez, puede causar la disminución de la presión negativa o vacío en el interior del contenedor. Preferiblemente, la humedad residual en el injerto es inferior al 6%, más preferiblemente menos del 3% y aun más preferiblemente del 0%. Puede incluirse un desecante en el contenedor. Es preferible que el desecante no sea reactivo con el injerto o la solución que se utiliza para hidratar el injerto.

25 Típicamente, el injerto óseo es rehidratado o reconstituido con una solución salina antes de la implantación en el paciente o receptor. De manera habitual, la rehidratación de injertos óseos liofilizados consiste en sumergir los injertos en la solución salina hasta que los injertos alcancen el nivel deseado de hidratación. Entre otros factores, dependiendo del tamaño del injerto, la rehidratación y reconstitución de un injerto de hueso, puede tener cualquier duración, desde una hora a unos pocos días. Aunque es deseable lograr la penetración uniforme de la solución y la rehidratación homogénea de injertos óseos, es generalmente difícil lograr estos objetivos en el corto período de tiempo exigido normalmente en ambientes quirúrgicos.

35 Los contenedores de implantes médicos divulgados y descritos en este documento proporcionan un medio por el cual los injertos de hueso, que han sido liofilizados o deshidratados de cualquier otra forma, pueden ser rápidamente y uniformemente hidratados y reconstituidos antes de la implantación. Debido a que los contenedores de implantes médicos mantienen sustancialmente la presión negativa durante la hidratación/reconstitución del injerto, el tiempo para la hidratación o la reconstitución se reduce drásticamente. La penetración de la solución en el implante es mejorada gracias al efecto de succión inducido por el vacío. La presión negativa produce un diferencial de presión que empuja la solución en el intersticio o en los poros del implante. Una vez que la solución se distribuye en los poros, puede ser además, distribuida en todo el implante mediante la acción capilar.

40 En una realización, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona hidratación y reconstitución sustancial, junto con la siembra y carga de los componentes biológicos y células asimismo sustancialmente uniformes, dentro de una hora de infusión. En otras realizaciones, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona hidratación sustancial y reconstitución, junto con la siembra y carga de los componentes biológicos y células asimismo sustancialmente uniformes, dentro de 30 minutos de infusión. En aún otras realizaciones, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona hidratación sustancial y reconstitución, junto con la siembra y carga de los componentes biológicos y células asimismo sustancialmente uniformes, dentro de 20 minutos de infusión. En aún otras realizaciones, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona hidratación sustancial y reconstitución, junto con la siembra y carga de los componentes biológicos y células asimismo sustancialmente uniformes, dentro de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 ó 6 minutos de infusión. En otras adicionales realizaciones, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona hidratación sustancial y reconstitución, junto con la siembra y carga de los componentes biológicos y células asimismo sustancialmente uniformes, dentro de 5 minutos o menos de infusión incluyendo 2, 3 o 4 minutos y preferiblemente inferior o igual a 1 minuto.

60 Aun cuando se puede obtener la siembra o carga uniforme de los injertos, el próximo desafío es asegurar que los componentes biológicos y las células pueden vincularse al injerto en tal manera que no precipitan incorrectamente fuera del injerto una vez dentro del cuerpo del paciente. Por ejemplo, la prematura o excesiva precipitación de Proteína Ósea Morfogenética (BMP) desde el implante de prótesis en los tejidos que lo rodean, se ha comprobado que estimula la formación de hueso en lugares no deseados. En estas condiciones, se ha observado el crecimiento ectópico de hueso en tejidos musculares que rodean el implante y en los casos más graves, que se refieren a

implantes en el área cervical de la columna vertebral, se ha detectado crecimiento ectópico de hueso que rodea completamente la tráquea del sujeto cerrando su paso de aire y causando ahogamiento. Por consiguiente, es deseable maximizar la eficacia de los componentes biológicos y células para vincularse con el implante de injerto con el fin de evitar su excesiva o prematura precipitación en los tejidos circundantes.

5 En una realización, se proporciona un método de vinculación rápida y sustancial de un componente biológico a un implante. Según como se utiliza en este documento, el término "rápidamente" se utiliza para comparar el tiempo reducido de vinculación de un componente biológico a un implante mediante el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío, divulgado, con los sistemas de vinculación mediante infusión anteriores de la Técnica. Están divulgados, sistemas de vinculación mediante infusión anteriores de la Técnica, por ejemplo, por W. Friess et al. en "Caracterización de esponjas absorbibles de colágeno tales como los portadores rhMBP-2" Journal of Pharmaceutics 187 (1999): páginas 91-99, el contenido del cual queda incorporado en su totalidad, en este documento, como referencia, especialmente con referencia a las propiedades de vinculación de rhMBP-2 a esponjas absorbibles de colágeno. En una realización preferente, el componente biológico está vinculado al implante en menos de quince minutos desde el momento en que se introduce en el conjunto de sistema de contenedor infundido por vacío que tiene dispuesto en su interior un sustrato poroso. Es más preferible que la vinculación rápida, se realice en menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos 7, menos de 6, menos de 5 años, menos de 4, menos de 3 ó menos de 2 minutos desde el momento en el que el componente biológico sea introducido en el sistema divulgado. En una realización especialmente preferente, el componente biológico se absorbe por el sustrato poroso en menos de un minuto. El término "sustancialmente", como se utiliza en este documento, se refiere en que al menos el cincuenta por ciento del componente biológico está vinculado al implante. En una realización preferente, "sustancialmente absorbido" o "sustancialmente vinculado" se refiere a, por lo menos, una vinculación del 60%, 65%, 70%, 75% o 80% del componente biológico al implante. En una realización especialmente preferente, el 85% del componente biológico está absorbido por el implante.

25 **En las figuras 1A-C, dado que el contenedor entero 110 está mantenido bajo presión negativa o vacío, es deseable reducir el volumen interno del contenedor 110 en la medida necesaria para albergar el injerto óseo. Esto es debido a que generalmente es más difícil mantener la presión negativa o el vacío para volúmenes mayores de espacio. En una realización preferente, el volumen del contenedor es sustancialmente igual que el volumen del injerto. De acuerdo con uno de los aspectos de esta realización preferente, el volumen del contenedor no es mayor que aproximadamente el 125%, preferiblemente no mayor de aproximadamente el 110% y más preferentemente no mayor del 105%, del volumen del injerto. De acuerdo con otro aspecto de esta realización preferente, el volumen del contenedor es igual al volumen del injerto. Tal como se muestra en las figs. 1A-C, el volumen interior de los contenedores 110 está delimitado por las medidas de las paredes, superior 150, laterales 160 y fondo 170. Un tabique 190 está acoplado al puerto de entrada 120 y situado externamente del contenedor 110 con el fin de reducir el volumen interno del contenedor 110 lo necesario para acomodar el tabique. Los materiales elegidos para el contenedor se caracterizan preferiblemente por tener altas propiedades como barrera anti-gas para asegurar que la presión negativa o el vacío se mantienen efectivamente a lo largo del tiempo.**

40 Otras realizaciones del contenedor de implantes médicos pueden ser igualmente diseñadas para reducir el volumen interno que se mantiene bajo presión negativa. Por ejemplo, las Figs. 4A-B representan un contenedor 400 para implante médico compuesto por virutas de injerto de hueso 402 contenidas dentro de la cavidad para injerto 410. Una tapa 450 está sellada herméticamente al labio periférico 412 de la cavidad del injerto 410 por una soldadura térmica 425. Como puede verse en las figuras 4A-B, las virutas 402 de injerto de hueso rellenan la cavidad del injerto 410 hasta cerca de capacidad total, de tal manera que el volumen de la cavidad del injerto 410 es sustancialmente el mismo que el volumen de las virutas de injerto de hueso 402. Un tabique 490 está colocado exteriormente de la cavidad del injerto 410. Preferentemente, el tabique es auto-sellante después de que con la punción con una jeringa y aguja se introduzca la solución hidratante a las virutas 402 del injerto con el fin de sostener la presión negativa/vacío dentro de la cavidad de injerto 410.

50 Refiriéndose a las figuras 1A-C, el sistema de implante médico 100 comprende además los elementos de soporte 180 para sostener el contenedor 110 en una posición vertical sustancialmente estable. Esto permite al cirujano colocar el sistema 100 sobre una superficie plana y simplemente insertar una jeringa con aguja en el puerto de entrada 120 con una sola mano sin tener que sostener el sistema 100 con la otra mano en la posición vertical deseada. Aunque las figs. 1AC muestran los elementos de soporte 180 como una sola pared periférica que rodea el contenedor 110, se entiende que la estructura de los elementos de soporte 180 no es tan limitada y puede incluir otras estructuras capaces de estabilizar el contenedor 110 en una posición lo suficientemente estable para permitir al cirujano efectuar la etapa de inyección en el puerto de entrada 120.

60 El sistema 100 que muestra, comprende, de manera general, una parte inferior 105 y una parte de tapa 135. Las dos partes, la parte inferior 105 y la parte de tapa 135 pueden ser herméticamente selladas juntas para que se pueda mantener una presión negativa dentro del contenedor 110. Es preferible situar la soldadura tan cerca como sea posible de la periferia del contenedor 110 con el fin de reducir aún más el volumen del espacio aéreo inútil que puede permanecer entre la parte inferior 105 y la parte de tapa 135. La soldadura resultante 125 puede rodear la periferia entera de contenedor 110. Aunque el sistema 100 representado en las figuras 1A-C se muestra como una

estructura de dos partes que comprende una parte inferior 105 de fondo y una parte de tapa 135, se entiende que el contenedor puede ser construido como una estructura integral, tal como un conjunto elástico con vacío.

5 Además de la rápida y uniforme hidratación o reconstitución de los injertos óseos, el sistema 100 promueve la distribución eficiente y uniforme y la siembra de componentes biológicos y células en los poros de los injertos. Los componentes biológicos y células pueden proporcionarse a los injertos en solución mediante una jeringa y aguja con la dimensión apropiada para asegurar que no se producen daños contra la estructura o a las células cuando estas pasan a través de la jeringa y aguja.

10 En general, hay tres maneras en que un injerto pueda ayudar a reparar un defecto óseo. El primero se llama osteogénesis, la formación de nuevo hueso por las células situadas dentro del injerto. El segundo es osteoinducción, un proceso químico en el cual moléculas contenidas dentro del injerto, tales como las proteínas morfogenéticas óseas, convierten las células del paciente en células que son capaces de formar hueso. El tercero es osteoconducción, un efecto físico por el cual el injerto forma una estructura en la que las células en el receptor son capaces de colonizar y formar hueso nuevo. Por lo tanto, los métodos y sistemas divulgados en este documento proporcionan información para preparar injertos óseos que incluyen componentes biológicos y células para ayudar a reparar un defecto óseo en el receptor.

20 La superficie interior del contenedor 110 está configurada preferiblemente para ayudar a preservar la integridad de los componentes biológicos y las células durante su suministro para el injerto de hueso. En particular, la cavidad de aguja 130 y las paredes laterales 160 y de fondo 170 están configuradas para promover el flujo laminar de la solución biológica recibida a través del puerto de entrada. Un flujo laminar es caracterizado tanto como flujo liso o no turbulento. Es preferible promover un flujo laminar y por lo tanto reducir el flujo turbulento, de la solución biológica, en el contenedor 110, con el fin de preservar la integridad estructural y de las células de los componentes biológicos y las células contenidas en la solución. Por ejemplo, un flujo turbulento, puede causar la partición y agrupamiento de las células. Eliminar o al menos reducir, los bordes afilados, las esquinas o ángulos dentro del contenedor 110 en donde la solución biológica entre en contacto con el contenedor, puede ayudar a promover un flujo laminar de la solución. Cabe señalar que debido a que el líquido es introducido en la cavidad de la aguja y hacia la superficie inferior 170 del contenedor 110, la configuración de la pared superior o parte de tapa 105 del contenedor 110 o donde las paredes laterales 160 se reúnen con la parte de tapa 105 del contenedor 110 no son tan críticos y ello no tienen necesariamente que ser curvos.

35 Como puede verse en las Fig. 1B-C, las paredes laterales 160 e inferior 170 del contenedor 110 convergen juntas como superficies curvas con radios de curvatura mayores que cero. Por otra parte, la superficie interna de la cavidad de aguja 130 también se presenta como una superficie curvada con una curvatura con radio mayor que cero. Además, como se muestra en una realización representada en la figura 1 C, la pared inferior 170 está inclinada hacia abajo desde el puerto de entrada 120 y la cavidad de aguja 130 para garantizar que la solución biológica fluya a través y se distribuya a lo largo de la longitud inferior del injerto. Este diseño no sólo asegura la distribución uniforme de la solución a través del injerto, sino que también previene la agrupación y residuos de la solución en la cavidad de aguja 130. Además, por lo tanto, las realizaciones de contenedor para implante médico proporcionan sustancialmente la dosificación precisa de una cantidad de componentes biológicos o células, para ser introducida. Sin embargo, debe entenderse que en otras realizaciones, la pared inferior 170 no necesita estar inclinada desde el puerto de entrada 120 y la cavidad de aguja 130.

45 Realizaciones alternativas proporcionan una manera eficiente de hidratar o reconstituir más de un solo injerto de hueso al mismo tiempo. Las Figs. 2A-B muestran una realización del contenedor para injerto médico 200, compuesto por un solo puerto de entrada 220 y su correspondiente cavidad de aguja 230 y un conjunto de cavidades de injerto 240A, 240B, 240C y 240D acopladas y en comunicación fluida con la cavidad de aguja 230 mediante los canales 235. Una vez que los injertos se han introducido en las cavidades de injerto 240A, 240B, C 240 y 240D se aplica al contenedor una comunicación de gas con el fin de evacuar el aire restante de las cavidades del injerto. El contenedor 200 puede constar de una parte inferior y una tapa que está opcionalmente herméticamente sellada mediante una soldadura 225. Puede proporcionarse un área de labio periférico 275 en la parte de tapa, donde el labio puede retirarse de la parte inferior para abrir el contenedor 200 y extraer los injertos de hueso.

55 Desarrollar equivalentes funcionales del tejido requiere la eficaz y uniforme de siembra de componentes biológicos y de células en matrices naturales o sintéticas, permitiéndoles crecer y desarrollarse en la estructura símil-de-tejido a partir de las células sembradas. De esta forma, continúa siendo altamente deseable la capacidad para sembrar eficiente y uniformemente los componentes biológicos y las células en estructuras tridimensionales.

60 La FIG. 3 representa un contenedor de injerto médico 300 según la invención, junto con una jeringa y aguja. El contenedor 300 está diseñado para dispersar la distribución de los deseados componentes biológicos y las células gracias a un conjunto de canales de suministro 335 a lo largo de una longitud de la cavidad de injerto 340. Preferiblemente, la cavidad de injerto 340 está moldeada con las dimensiones precisas y la forma del injerto del hueso deshidratado. Los componentes biológicos y las células pueden introducidos mediante jeringa y aguja a través del puerto de entrada 320 y en la cavidad de aguja 330. Se mantiene una presión negativa o un vacío en la cavidad de aguja 330, los canales de suministro 335 y la cavidad del injerto 340. Opcionalmente, puede acoplarse

un tabique 390 al puerto de entrada 320 con el fin de mantener la presión negativa o el vacío después de la punción con jeringa y aguja. El contenedor 300 puede ser sellado herméticamente mediante la soldadura 325 de manera periférica a la cavidad de aguja 330, los canales de suministro 335 y la cavidad del injerto 340.

5 La FIG. 5A representa otra realización de un contenedor para injerto médico 500. La figura 5B ilustra cómo un injerto médico situado dentro del contenedor para injerto médico 500 de FIG. 5A puede ser infundido con una jeringa y aguja 510 utilizando una composición acuosa conveniente. El contenedor 500 está diseñado para dispersar la distribución de los deseados componentes biológicos y células desde una distancia más cercana a la mitad del injerto médico gracias a un tabique 590 dispuesto por encima del injerto médico dentro de la cavidad de injerto 550. Esto puede ser especialmente aconsejable para los injertos médicos que resisten la difusión de la composición acuosa debido al tamaño de los poros pequeños u otros factores que influyen en las características de difusión del injerto médico, tales como la viscosidad de la composición acuosa. El contenedor para injerto médico 500 también puede utilizarse en los casos donde es deseable configurar un gradiente de concentración de los componentes biológicos o células dentro de un injerto médico para lograr una más alta concentración de componentes biológicos y células más cerca de la mitad del injerto médico y una menor concentración de componentes biológicos y células más lejos de la mitad del injerto médico. La jeringa y aguja 510 son insertadas en el injerto médico durante la infusión de la composición acuosa o la jeringa y aguja son sencillamente colocadas por encima o adyacentes al injerto médico durante la infusión. La cavidad del injerto 550 preferiblemente moldeada con las dimensiones y forma precisas del injerto médico. Los componentes biológicos y las células pueden ser suministrados vía jeringa y aguja a través del puerto de entrada 595 del tabique 590 al injerto médico situado dentro de la cavidad de injerto 550. El contenedor 500 puede ser sellado herméticamente mediante una soldadura 525 periférica a la cavidad de injerto 550 y pueden proporcionarse elementos de soporte 580 para apoyar el contenedor 500 en una posición sustancialmente estable y vertical.

25 Las composiciones acuosas utilizadas en esta invención con el fin de hidratar o reconstituir los injertos de hueso antes de su implantación pueden ser soluciones, emulsiones, micro emulsiones, suspensiones o combinaciones. Los materiales que funcionan como emulsionantes o también pueden estar presentes en tales composiciones acuosas. Ejemplos no limitantes de tales emulsionantes o ayudas para la suspensión incluyen medios para el crecimiento celular, sueros, medios de diferenciación, medios nutricionales, monoglicéridos, ésteres de monoglicéridos, diglicéridos, ésteres de diglicéridos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de propilenglicol de ácidos grasos, estearatos de sorbitán, lactatos de estearoil, lecitinas, fosfolípidos, glicolípidos, ésteres de celulosa, goma gellan, pectina, goma xantana, goma rhamsum y goma arábica.

35 En algunas realizaciones, las composiciones acuosas contienen, además, solventes biocompatibles miscibles con agua o mezclas de solventes. Preferiblemente, los solventes biocompatibles son líquidos orgánicos en los que los injertos son al menos parcialmente solubles a temperaturas corporales de los mamíferos y son sustancialmente no tóxicos en las cantidades utilizadas. A manera de ejemplo no limitante, los solventes biocompatibles adecuados, miscibles con agua, incluyen etanol, acetona y dimetilsulfóxido, así como otros adecuados solventes biocompatibles miscibles con agua.

40 Los componentes biológicos utilizados en relación con los implantes médicos divulgados en este documento incluyen cualquier agente que produzca un resultado biológico, terapéutico o farmacológico en un ser humano. Los ejemplos de componentes biológicos incluyen, por ejemplo, cualquier factor  $\beta$  de transformación de crecimiento (TGF- $\beta$ ), el factor de diferenciación de crecimiento (GDF) y las proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago (CDMP); cualesquiera proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) incluyendo, pero no limitando, a BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-6, BMP-7, 8-BMP, BMP-9, BMP-10 y BMP-11; los factores angiogénicos; factores de crecimiento; hormonas; los anticoagulantes tales como heparina y sulfato de condroitina; fibrinolíticos tales como tPA; aminoácidos, péptidos y proteínas, incluyendo las proteínas y péptidos sintéticos e incluyendo encima como la estreptoquinasa, uroquinasa y elastasa; agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, como hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, prometazina, aspirina, ibuprofeno, indometacina, ketoralac, meclofenamato, tolmetina; los bloqueantes de los canales cálcicos, tales como diltiazem, nifedipina, verapamil, antioxidantes como el ácido ascórbico, carotenos and alfa-tocoferol, alopurinol, trimetazidina; antibióticos, tales como gentamicina, noxiotilina y otros antibióticos para prevenir la infección; agentes procinéticos para promover la movilidad intestinal, agentes para prevenir entrecruzamiento de colágeno tales como cis-hidroxi prolina y D-penicilamina; agentes anti cancerígenos; neurotransmisores; hormonas; agentes inmunológicos incluyendo elementales y anticuerpos; ácidos nucleicos, incluyendo agentes antisentido; medicamentos para la fertilidad, drogas psicoactivas y los anestésicos locales, entre numerosos agentes adicionales.

60 Un grupo de componentes biológicos que son especialmente útiles en conjunción con injertos de hueso, son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Las BMPs son un grupo de factores de crecimiento y citocinas, conocidas por su capacidad para inducir la formación de hueso y cartílago. Actualmente, existen unos veinte BMPs conocidos, incluyendo por ejemplo BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, 6-BMP, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10 y BMP-11. Las BMP-2 y BMP-7 son unos bien conocidos y utilizados BMPs pertenecientes al Grupo Factor beta de Transformación del Crecimiento (Transforming Growth Factor beta) (TGF- $\beta$ ) súper familia de proteínas, una gran familia de proteínas reguladoras estructuralmente relativas con la célula. Las BMP-2 y BMP-7 son BMPs osteogénicas que inducen potente diferenciación de osteoblastos en una variedad de tipos de célula. Las BMPs,

utilizadas en unión con los injertos médicos descritos, pueden derivarse de animales, de humanos (hBMP) o a través de técnicas de ADN recombinante (rhBMP). Una especialmente bien conocida BMP es actualmente utilizada en los injertos óseos es rhBMP-2, también conocida como Dibotermín Alfa. La rhBMP-2 puede ser fabricada eficazmente utilizando técnicas de ADN recombinante mediante ingeniería genética o manipulación de células, bacterias, o levadura para producir rhBMP-2 en grandes cantidades, lo que es bien conocido en la Técnica. En la solicitud de patente, US Patent Application Publication Número 2004/0230310 A1, titulado "Uso de Proteínas Morfogénicas para tratar la enfermedad de disco en seres humanos" que se incorpora en su totalidad en este documento, como referencia, se describen ejemplos de la utilización de BMPs en injertos de hueso.

Los métodos y sistemas divulgados en el presente documento pueden ser utilizados también para suministrar células vivas a sitios deseados en un receptor. Ejemplos de tales células incluyen, pero no están limitadas, a las células madre, células madre derivadas de médula ósea, células madre derivadas de tejido adiposo, células estromales de la médula ósea, células óseas, hepatocitos, queratinocitos, condrocitos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células madre mesenquimales, fibroblastos, células musculares, células parenquimales, células de origen intestinal, células nerviosas, células de la piel, células endoteliales, células epiteliales y las células musculares lisas. Estas células pueden ser cultivadas, diferenciadas o extendidas antes de la siembra. Estas células pueden ser concentradas antes de su implantación, por métodos tales como centrifugación o filtración. De esta forma, los implantes médicos sembrados pueden funcionar como sustratos de adhesión, células de anclaje para ser trasplantadas para mejorar la supervivencia, crecimiento y en última instancia, injerto o anclaje de las células trasplantadas al tejido celular normal.

Otros tipos de células útiles incluyen las células madres derivadas de médula ósea, las células madre derivadas de adiposo, las células estromales de la médula del hueso, condrocitos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células madre mesenquimales, fibroblastos, células musculares, los hepatocitos, células parenquimales, células de origen intestinal, las células nerviosas y células de la piel y ser proporcionadas como explantes del tejido primario, preparaciones de explantes de tejido primario, células aisladas, líneas celulares, líneas celulares transformadas y células del huésped. Los implantes incluyen también componentes adicionales tales como agentes biológicamente activos o factores que alteran las características, tales como la osteoinductividad, agentes metabólicos, reabsorbibilidad, resistencia, adherencia, inyectabilidad y características de fricción.

Las inmuno respuestas a injertos corticales de hueso y otros sustratos (por ejemplo, cemento, IPN, etc.) son minimizados mientras se mejora el potencial osteoinductivo modificando los injertos para conseguir una superficie osteoinductiva que el cuerpo del receptor va a aceptar como su propio tipo de tejido y por lo tanto no lo rechazará o de lo contrario fallarán. Tal proceso proporciona para la superficie osteoinductiva una modificación que será obtenida mediante la siembra de la superficie de un sustrato poroso de injerto con células periosteales que han sido previamente recogidas bien del receptor del injerto o de una fuente donante alogénica o xenogénica.

Los sustratos porosos que pueden utilizarse en relación con la divulgados métodos y sistemas incluyen autoinjerto, aloinjerto, xenoinjerto u otros materiales de origen animal no humano como el colágeno y otros implantes que incluyen péptidos. Pueden también ser utilizados como materiales de injerto materiales sintéticos incluyendo cerámica, hidroxiapatita, polímeros bioabsorbibles y similares. En algunas realizaciones, el sustrato poroso es una matriz osteoconductiva que incluye una esponja matriz biológicamente aceptable. Preferentemente, la esponja es una esponja de colágeno como se describirá con mayor detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, el tamaño del poro de los injertos puede configurarse para acomodar las dimensiones de los componentes biológicos y células que van a ser distribuidos o sembradas en los injertos. El tamaño del poro es óptimamente configurado para dar cabida a la viscosidad de las composiciones acuosas que se utilizan para hidratar o reconstituir los injertos. La alta viscosidad de ciertas composiciones acuosas puede ser debida a la inclusión de proteínas y otras biomoléculas de alto peso molecular. Por lo tanto, la consideración del tamaño de poro de la estructura, la densidad y la porosidad pueden configurarse para influir en el comportamiento y la calidad del tejido regenerado. El tamaño del poro para regeneración de hueso es preferentemente de alrededor de 100 a cerca de 600 micrones.

Los polímeros sintéticos convenientes para el uso en injertos sintéticos incluyen, pero no se limitan a: polihidroxibutirato (PHB); poli-n-vinil pirrolidona; poliortoésteres; polianhídridos; policianoacrilatos; polidepsipeptidos; polidihidropiranos; poliv-DL-lactato (PDLLA); poliésteramidas; poliésteres de ácido oxálico; poliglicólido (PGA); poliláctido-co-glicólido (DLPLG); polietereterketona (PEEK); polieterketoneketona (PIKCC); poliiminocarbonatos; polilactatos (PLA); poliortoésteres; poli-p-dioxanona (PDO); polipéptidos; polifosfazenos; polisacáridos; poliuretano (PU); alcohol polivinilo (PVA); poli-β-hidroxipropionato (PHPA); poli-β-hidroxibutirato (PBA); poli-γ-valerolactona; ácidos poli-β-alcanoicos; ácido poli-β-málico (PMLA); poli-ε-caprolactona (PCL) y carbonato trimetileno (TMC), por mencionar unos pocos.

En algunas realizaciones, los sustratos sintéticos incluyen polímeros que son bioestables, mientras que en otras realizaciones, los sustratos sintéticos incluyen polímeros que son biorreabsorbibles. Los sustratos inorgánicos adecuados incluyen varios tipos de fosfatos de calcio de producción natural y no-natural, tales como fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfato de calcio apatita pobremente cristalizado (PCA), fosfato de calcio amorfo (ACP).

Debido a que el principal componente inorgánico del hueso consiste en fosfato cálcico (CaP) apatita altamente sustituido, los sustitutos sintéticos de hueso que incluyen las distintas formas de CaP son especialmente útiles. Esos mencionados materiales basados en CaP incluyen hidroxiapatita, apatita carbonatada, fluoroapatita, fosfato tricálcico-alfa y beta, fosfato tetracálcico, fosfato octacálcico y combinaciones de los mismos. Los materiales están configurados preferentemente para tener un apropiado nivel de porosidad, tamaño del poro y tamaño de las interconexiones entre los poros.

En una realización, el sustrato poroso es una matriz absorbente bioabsorbible. Preferentemente, la matriz absorbente bioabsorbible es absorbente, flexible, maleable, compresible, porosa, biorreabsorbible y biocompatible. Un ejemplo de una matriz absorbente adecuada es una esponja de colágeno absorbible (ACS) que se divulga en la solicitud de patente U.S. Patent Application Publication N° 2007/0142916 A1, titulada " Composición, método e implante de injerto óseo," que en el presente documento se ha incorporado, en su totalidad, como referencia.

En una realización preferente, la matriz absorbente es derivada del Tipo I de colágeno del tendón bovino, dado que el colágeno animal tipo I es homólogo al colágeno humano Tipo I. Sin embargo, pueden utilizarse otros colágenos fibrilares tal como los tipos II, III, V y XI y colágeno fisiológicamente compatible obtenido de animales transgénicos o cualquier combinación de los mismos ya sea en singular o en combinación con el tipo I para formar la matriz absorbente. Después de la recogida, el tendón se trata con soluciones alcalinas y el colágeno extraído puede ser reticulado mediante calor o un agente reticulante químico adecuado (aldehído, DHT, UV, etc.) para convertirse en un material similar a una esponja que es especialmente adecuado como una esponja de colágeno reabsorbible. Después de que el colágeno está formado en una esponja, el material es esterilizado utilizando un producto o método químico adecuado, tal como óxido de etileno, etanol, etc. Preferiblemente, la matriz de colágeno debe tener poros de un tamaño suficiente y cantidad para permitir que el tejido en crecimiento se infiltre en ella. Preferiblemente, la gama de tamaño de poro varía de unos 10  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , más preferible de unos 50  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  siendo los poros superficiales menores que los transversales (internos). En realizaciones preferentes especiales, la gama de diámetro de los poros superficiales varía desde aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$ , siendo más preferido alrededor de 70  $\mu\text{m}$ . La gama de diámetro de los poros transversales puede variar desde 50  $\mu\text{m}$  hasta 300  $\mu\text{m}$ , siendo más preferible de alrededor de 150  $\mu\text{m}$ . Una forma preferente de la matriz reabsorbible osteoconductiva puede describirse como una matriz compatible porosa biológicamente homogénea con una densidad isopicnica con un medio líquido de cultivo, con carácter similar a una esponja y diámetro de menos de 2 milímetros, teniendo cada partícula una multiplicidad de huecos, representando los huecos al menos el 10 por ciento del volumen total de la matriz, estando los huecos conectados con poros de diámetro menor de 100 micrómetros, que conectan los huecos al exterior de la matriz. La matriz del colágeno también puede incluir una multitud de nanofibras sustancialmente rígidas dispersas dentro de la matriz de colágeno con la finalidad de proporcionar integridad estructural a la matriz de colágeno con otros extremos de nanofibras proyectándose fuera de una superficie de la matriz de colágeno para proporcionar cerdas superficiales diferenciales portantes.

En esta aplicación, el término "sustancialmente rígido" significa sustancialmente desprovisto de flexibilidad en el medio ambiente utilizado. La rigidez puede medirse por el módulo de elasticidad en cizalladura. En este aspecto, "sustancialmente rígida" puede aplicarse a una nanofibra con un módulo de elasticidad entre 4,2 MPa y 15,0 MPa, deseable entre 6,0 y 14,0 MPa y preferiblemente entre 9,0 MPa y 12,0 MPa, con los valores más altos de MPa obtenibles por reticulación.

El término "nanofibra" es aplicable a una nanoestructura alargada cuyo eje principal es más largo que los otros dos ejes principales y con una relación de aspecto mayor a uno o mayor que 10 o superior a 500. Un eje más corto puede ser menor de 100 nanómetros o menor de 10 nm o inferior a 5 nm. La nanofibra puede tener un diámetro sustancialmente uniforme. El diámetro puede mostrar una variación menor del 20%, inferior al 5%, o menos del 1% en la región de mayor variabilidad. Normalmente el diámetro es evaluado lejos de los extremos de la nanofibra sobre una parte central de un 20%, 50% o un 80% de la nanofibra. En otras realizaciones, la nanofibra tiene un diámetro no uniforme, variando en diámetro a largo de su longitud. También, en ciertas realizaciones, la nanofibra puede ser sustancialmente cristalina y/o sustancialmente monocristalina.

Las "nanofibras" incluyen estructuras tales como nanohilos, nanofibrillas (*nanowhiskers*), nanofibras semiconductoras, nanotubos de carbono y nanotubos de materiales compuestos (*composite nanotubes*) en tanto como proporcionan una superficie de cerdas a la matriz reabsorbible osteoconductiva de la invención. Las nanofibras pueden incluir cualquier número de materiales, basados en ciertos factores, incluyendo la utilización intencional de la superficie de cerdas, condiciones de utilización tales como temperatura, pH, luz como sensibilidad UV, entorno de colocación, reacciones debe soportar la matriz reabsorbible osteoconductiva, durabilidad requerida de la superficie e incluso el coste. La ductilidad y la resistencia a la rotura de las nanofibras pueden variar dependiendo de composición. Por ejemplo, hilos de nanofibras de cerámica ZnO pueden ser más frágiles que nanohilos de silicio o cristal, mientras que los tubos de nanofibras de carbono pueden tener una mayor resistencia.

Aunque el colágeno es un buen ejemplo de una nanofibra rígida, otros polímeros son también adecuados. Pueden ser convenientes los derivados de otros biopolímeros que tienen forma de barra, tales como la tubulina y queratina que pueden ser fabricados en forma de nanofibras rígidas, mientras mantienen una integridad de estructura fibrilar

bajo las condiciones de formación de la matriz. Una nanofibra preferida es un polímero a escala nanométrica, de forma de barra que es compatible con agua y tiene grupos superficiales polares tales como grupos amino.

Otras nanofibras para aplicaciones de la matriz reabsorbible osteoconductiva incluyen silicio, ZnO, TiO, carbono, nanotubos de carbono, vidrio y cuarzo. Las nanofibras divulgadas en este documento pueden ser recubiertas o funcionalizadas con el fin de mejorar o añadir propiedades. Los polímeros, cerámicas o moléculas pequeñas pueden utilizarse como materiales de recubrimiento. Los recubrimientos pueden añadir características tales como la resistencia al agua, propiedades mecánicas o eléctricas mejoradas o especificaciones para determinados análisis. Además, pueden vincularse o asociarse con las nanofibras fracciones específicas o grupos funcionales.

En una realización, la nanofibra está formada por colágeno metilado. Este material tiene una temperatura relativamente alta de transición vítrea (por encima de 25°C) que proporciona integridad estructural mejorada y superficie de cerdas a la matriz osteoconductiva reabsorbible.

Las diferentes aplicaciones de la invención requerirán diferentes densidades de nanofibras por unidad de volumen de la matriz osteoconductiva. En algunas aplicaciones utilizadas como ejemplo, el número de nanofibras por unidad de volumen es de 1 nanofibra por 10 microm<sup>3</sup> a 200 nanofibras por microm<sup>3</sup> de volumen de matriz o desde 10 nanofibras por microm<sup>3</sup> a 100 nanofibras por microm<sup>3</sup> o desde 25 nanofibras por microm<sup>3</sup> a 75 nanofibras por microm<sup>3</sup> de volumen de matriz. En otras realizaciones con nanohilos, una densidad puede variar desde alrededor de 1 a 3 nanohilos por micrón cúbico a 2.500 nanohilos por micrón cúbico de matriz.

Una superficie total de una nanofibra puede ser incrementada mediante el aumento del espesor o diámetro. El diámetro puede ser controlado mediante la elección de la composición, condiciones de crecimiento, fracciones o recubrimientos. Un espesor preferido de nanofibras es entre 5 nm a 1 micrón; de 10 nm a 750 nanómetros o desde 75 nm a 100 nanómetros.

Además del diámetro, el área superficial de nanofibras y la correspondientemente superficie de cerdas de la matriz reabsorbible osteoconductiva están influidos por la longitud de las nanofibras. Para algunos materiales de fibra, el aumento de la longitud da como resultado el aumento de la fragilidad. En consecuencia, las longitudes preferentes de la fibra estarán entre 2 micrones y 1 mm; entre 10 micrones y 500 micrometros o entre 50 micrones y 100 micrones. Algunas realizaciones de la invención tienen nanofibras de aproximadamente 40 nm en diámetro y aproximadamente 50 micrones de longitud.

Las nanofibras pueden ser sustancialmente homogéneas en las propiedades del material o pueden ser heterogéneas. Pueden ser fabricadas de cualquier material o materiales convenientes. Las nanofibras pueden incluir materiales «puros», materiales sustancialmente puros y materiales dopados. Pueden incluir aisladores, conductores o semiconductores. El material de las nanofibras puede variar dependiendo de la funcionalización específica tales como durabilidad, costo o condición de utilización. El material de las nanofibras puede ser el mismo que el material de la matriz osteoconductiva reabsorbible o el material de la nanofibra puede ser diferente de la matriz.

## PRODUCIENDO LA MATRIZ CON NANOFIBRAS DISPERSAS

La matriz osteoconductiva reabsorbible está compuesta de fibras dispersas, algunas de las cuales tienen extremos que están elevados por encima de la superficie de la matriz en forma de cepillo de cerdas. En una realización, la matriz tiene al menos una parte de nanofibras dispersas que tienen extremos que están elevados por lo menos 10 nm y en otras realizaciones al menos 100 nm por encima de la superficie de la matriz. Una composición regenerativa preferente de hueso incluye extremos de cerdas nanofibras extendiéndose entre 40 nm y 100 nm por encima de una superficie de matriz de colágeno. Las cerdas forman una textura compleja similar a un cepillo que soporta diferencialmente estructuras adyacentes para proteger la estructura celular de la matriz osteoconductiva reabsorbible de la pérdida de material osteoinductivo debida a compresión. Además, la textura similar a un cepillo puede proporcionar una superficie de fricción resistente al deslizamiento contra superficies adyacentes y que se adapta con seguridad a las superficies adyacentes.

En un método preferente de producir la matriz que contiene nanofibra, las nanofibras se dispersan en una dispersión de colágeno, que luego se seca mientras se agita en una matriz fina o en una hoja. La dispersión de colágeno puede ser realizada siguiendo cualquier proceso conocido. Por ejemplo, los documentos de patente US Pat. No.3.157.524 y US Pat No 3.520.402 divulgan las preparaciones para la dispersión de colágeno. Estas referencias divulgan la utilización de láminas de colágeno de tendón en una solución ácida para formar una dispersión que luego es extruida en un baño coagulante. En particular, la dispersión del colágeno puede ser preparada según la divulgación de la Narotam US Pat No.5.997.895, asignada a Integra Lifesciences Corporation. Esta divulgación de la Pat US No. 5.997.895 se incorpora en su totalidad en este documento como referencia.

En el procedimiento establecido en la US Pat. No.5.997.895, una fuente natural de colágeno tipo I, tal como piel, tendón, ligamento o hueso, es, en primer lugar, limpiada mecánicamente o, a mano, de grasa, fascia y otra materia extraña y, lavada. La limpieza y lavado del material que contiene el colágeno lo reduce en tamaño, generalmente por laminación o trituración. El material se somete entonces a un tratamiento enzimático, al mismo tiempo bajo agitación

- intermitente con una enzima proteolítica, como la ficina o pepsina, con el fin de retirar las impurezas no colaginosas que pueden causar actividad antigénica. El tratamiento enzimático también aumenta el colágeno por eliminación de la elastina. La cantidad de enzima añadida al material colágeno y las condiciones en que la digestión enzimática se lleva a cabo dependen de la enzima particular utilizada. Generalmente, cuando se utiliza ficina, los que es común, se ajusta el pH a aproximadamente 6,0 a 6,3 y el material colágeno es digerido aproximadamente durante 1 a 2 horas a una temperatura de unos 36,5°C a 37,5°C con una parte de ficina por 150 partes de material colágeno. Después de la cantidad de tiempo requerido, la enzima es inactivada, por ejemplo, añadiendo una solución de un agente oxidante, tales como clorito sódico (cuando la enzima es ficina).
- El material conteniendo colágeno, tratado con la enzima, es lavado para quitar el exceso de enzima y las impurezas proteínicas no colaginosas. Preferentemente, el lavado es realizado con agua desionizada y ultrafiltrada. El colágeno puede, además, lavarse con peróxido de hidrógeno acuoso diluido.
- El colágeno, digerido mediante enzima, que contiene material, pueden entonces ser sometido a un tratamiento alcalino a un pH de 13 a 14, a una temperatura de 25°C a 30°C durante un período de alrededor de 35 a 48 horas, preferiblemente alrededor de 40 horas. El tratamiento alcalino puede realizarse en una solución acuosa de 5% de hidróxido de sodio y 20% de sulfato de sodio. El tratamiento alcalino elimina glicoproteínas y lípidos contaminantes. La solución es entonces neutralizada con un ácido adecuado, como ácido sulfúrico acuoso y lavada meticulosamente.
- El material colágeno es entonces hinchado aun mas mediante una solución adecuada de ácido que no causa reticulación del colágeno. Los ácidos adecuados incluyen el ácido acético, ácido clorhídrico y ácido láctico. Se utiliza el ácido para ajustar el pH alrededor de 2 a 3 de la dispersión ácida del colágeno.
- La mezcla dispersa de colágeno es entonces homogeneizada, por ejemplo, en una licuadora u homogeneizador, con el fin de disociar aun más las fibras. La mezcla es entonces filtrada para eliminar material no hinchado no colaginoso; por ejemplo, pasando la dispersión a través de una malla de acero inoxidable de 100 mesh.
- Las nanofibras de la invención se añaden a la dispersión filtrada en un porcentaje de peso calculado sobre un número de nanofibras por unidad de volumen de matriz, preferiblemente por unidad de volumen de matriz de colágeno. Por ejemplo, un porcentaje del peso añadido de nanofibras puede ser calculado para proporcionar 1 nanofibra por 10 microm<sup>3</sup> a 200 nanofibras por microm<sup>3</sup> de volumen de matriz de colágeno. Luego se vierte la matriz de colágeno con la dispersión de nanofibras en una bandeja adecuada. La dispersión es congelada y liofilizada mientras se agita durante alrededor de 1 a 48 horas.
- La agitación mecánica de la solidificación de la dispersión asegura una orientación al azar de las nanofibras con lo que al menos una parte de extremos de nanofibras sobresale de una superficie de una superficie de la matriz de colágeno solidificada. La agitación puede ser aplicada uniformemente para proporcionar superficies uniformes de cerdas. O bien, la agitación puede ser aplicada selectivamente para producir superficies con cerdas seleccionadas.
- La agitación puede ser aplicada, por ejemplo, mediante sonicación de baja frecuencia o por balanceo de la bandeja o removiendo la dispersión en solidificación. En un ejemplo, la agitación es aplicada mediante la vibración ultrasónica en una frecuencia entre 2 kHz a menos de 20 kHz o en una frecuencia entre 3 kHz a 10 kHz y preferiblemente en una frecuencia entre 4 kHz a 8 kHz. La agitación es aplicada hasta que la dispersión ha solidificado suficientemente para soportar al menos algunas de las nanofibras en una orientación que proyecta sus extremos a través de la superficie de la matriz para formar la superficie de cerdas de la invención. La protrusión de los extremos de las cerdas por encima de la superficie de la matriz de colágeno puede ser no uniforme entre 1 nm a 1000 nm o entre 10 nm a 500 nm o 100 nm a 300 nm. Cualquier grado de protrusión de la longitud de las cerdas proporciona una mejorada mayor resistencia a la carga comparada con la superficie de las nanofibras adjuntas. La protrusión puede ser definida como al menos 0,1% de media de la longitud hasta el 99% de promedio de longitud fuera de la superficie de la matriz, deseablemente del 1% a un 90% y preferiblemente de 10% a menos de 50% de promedio longitud de la protrusión de las nanofibras fuera de la superficie de la matriz.
- La esponja de cerdas resultante puede tener un espesor desde 2,0 mm a 6 mm, preferiblemente unos 3 mm. La densidad de la dispersión que contiene nanofibras y el ciclo de liofilización dictan la densidad de la esponja y el tamaño del poro. La matriz de colágeno con cerdas tiene poros de una cantidad y tamaño suficiente para permitir la infiltración del cultivo de tejidos. El tamaño del poro puede variar desde 10 µm a 500 µm, preferiblemente desde 50 µm a 150 µm, siendo la superficie de los poros menor que la de los poros transversales (internos).
- Puede proporcionarse una película, según la invención, mediante el moldeo de una dispersión de la nanofibra que contiene colágeno con una concentración de colágeno de 0,1 a 10% de sólidos (peso/volumen) y de 0,005 a 0,5% (peso/peso en sólidos de colágeno) en un adecuado plastificante biocompatible tal como la glicerina. La concentración de plastificante puede ser de cerca de 0,1% y la concentración de colágeno de alrededor del 1%, preferiblemente 0,75% y la concentración de nanofibras pueden variar del 0,01% al 50%, deseablemente del 0,1% al 10% y preferiblemente del 1% al 5%. Un volumen de la dispersión es vertido en un conveniente contenedor no adhesivo y evaporado para proporcionar una película con un espesor del 0,05 a 2,0 mm y preferiblemente de unos 0,5 mm. La película puede ser reticulada con calor o mediante un agente químico reticulante.

En otro método, una esponja o película de colágeno es moldeada mediante fibras de colágeno derivadas de ácido láctico que contienen las nanofibras. Las fibras de colágeno son producidas mediante un proceso que consiste en la dispersión de una fuente de colágeno libre de virus y priones tal como láminas de tendón bovino tratado con álcali, en una solución acuosa de ácido láctico, homogeneizando la dispersión, filtrando la dispersión de ácido láctico homogeneizada y precipitando las fibras de colágeno de la dispersión de ácido láctico homogeneizada por la adición de suficiente hidróxido de amonio para ajustar el pH hasta alrededor de 4,6-4,9.

Una esponja de colágeno y una película laminada pueden ser preparadas mediante el moldeo de una película de colágeno; secado de la película; moldeo de una nanofibra que contiene lodo de colágeno en la película secada; liofilización de la combinación de lodo/película; y reticulación del producto laminado liofilizado exponiéndolo a vapores de una solución acuosa de formaldehído (preferiblemente con una concentración de formaldehído de un 9,6%) durante noventa minutos a unos 25° C, seguido por ventilación mediante aire forzado durante alrededor de una hora.

Una vez implantada, la esponja de colágeno se somete a reabsorción durante un período de 4 a 12 semanas vía degradación mediada-por-células mediante macrófagos. El colágeno puede proporcionar una superficie favorable el anclaje de células durante la temprana formación osteoide. Entonces se produce la reabsorción. Una matriz de colágeno, tal como una esponja absorbible de colágeno, posee todas las propiedades de un portador ideal para muchos agentes biológicos y es particularmente adecuado para portar todo tipo de materiales morfogenéticos de hueso, incluyendo rh-BMP-2. En una realización, el material morfogenético óseo puede ser BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, 6-BMP, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10 y BMP-11.

Otras realizaciones de la presente invención incluyen la utilización del conjunto de sistema de contenedor infundido por vacío divulgado en este documento conjuntamente con un dispositivo INFUSE® Bone Graft (Medtronic Sofamor Danek, Memphis, Tennessee) y puede incluir un dispositivo Bone Graft/LT-CAGE® Lumbar Tapered Fusion (Medtronic Sofamor Danek, Memphis, Tennessee) colocado dentro del contenedor médico de infusión por vacío (Vacuum Infused Package) (VIP). El dispositivo INFUSE® consta de dos piezas: (1) un proteína humana lograda por ingeniería genética (rhBMP-2) para estimular la cicatrización del hueso y; (2) una estructura de esponja absorbible de colágeno hecho de colágeno de vaca (bovino) que porta el BMP, como se describió anteriormente.

En otras Realizaciones adicionales, el contenedor al vacío puede contener también otros elementos dispuestos en su interior tales como dispositivos mecánicos, incluyendo placas metálicas, alfileres, barras, alambres, tornillos y Graft/LT-CAGE's® o cualquier otro elemento estructural adecuado tanto de manera aislada como en combinación con un sustrato poroso.

El sustrato poroso deshidratado por congelación (liofilizado), tal como una matriz absorbente, puede ser difícil de hidratar y es a menudo hidratado ineficazmente en el quirófano (OR) debido a la cantidad de tiempo necesaria para hidratar el sustrato poroso utilizando métodos convencionales "de remojo". El contenedor médico divulgado en este documento proporciona un método novedoso para rehidratar rápidamente un sustrato poroso, reduciendo la fragilidad del sustrato y suministrando los componentes biológicos y las células al sustrato poroso de una manera eficaz y eficiente. El contenedor sella un sustrato poroso deshidratado bajo un vacío extremo mediante la evacuación del aire de los poros del sustrato. Durante la infusión del fluido, el vacío introduce el fluido en el sustrato poroso, infundiéndolo rápidamente los poros y rehidratando el implante.

## EXPERIMENTOS

Los ejemplos siguientes enseñan implantes médicos y métodos y sistemas para hidratar y sembrar implantes médicos con componentes biológicos. Estos ejemplos son solamente ilustrativos y no intentan limitar el alcance de la invención divulgada en este documento. Los métodos de tratamiento que se describen a continuación pueden ser optimizados utilizando técnicas empíricas bien conocidas por los que conocen bien la Técnica. Es más, los artesanos con habilidad serían capaces de usar las enseñanzas que se describen en los siguientes ejemplos para practicar el alcance completo de la invención divulgada en este documento.

### EXPERIMENTO 1

Se realizó un experimento usando una solución acuosa que contenía una concentración conocida de rhBMP-2 y múltiples esponjas ACS. Se suministraron 150µg de rhBMP-2 (Infuse®, Medtronic, Inc., Memphis, TN) por centímetro cúbico de portador en esponjas de colágeno absorbible (ACS, Medtronic, Inc.), utilizando tanto un método de goteo (remojo) o vía un Contenedor de Infusión por Vacío (Vacuum Infused Packaging) (VIP). El rhBMP-2 aplicado mediante el método de goteo fue permitido ser remojado durante 15 minutos mientras las muestras VIP sólo se les permitió a 1 minuto para vinculación. El rhBMP-2 sin consolidar fue extraído de las esponjas ACS siendo colocado en solución salina excesiva en un agitador orbital a 37° C durante 1 hora. Se utilizó un kit ELISA rhBMP-2 (Leinco Technologies, Inc., St. Louis, MO) para determinar la cantidad de rhBMP-2 consolidado con las muestras ACS después de la hora de enjuague. Entonces, los datos fueron analizados utilizando un ANOVA unidireccional (p<0,05) y una prueba post-hoc de diferencia significativa honesta de Tukey para comparaciones múltiples.

En la figura 6, se muestra la cantidad de rhBMP-2 unido a las ACS remojadas por goteo después de 15 minutos de tiempo de vinculación versus las ACS después de 1 minuto de tiempo de infusión en el VIP. Algunas esponjas ACS se habían empapado en la solución de rhBMP-2 (por goteo) y otras esponjas ACS fueron infundidas (usando la misma solución rh-BMP-2) en el interior de un contenedor sellado al vacío. Como puede verse en la figura 6, las ACS infundidas en el VIP mostraban una mayor vinculación estadística de rhBMP-2 en comparación con las ACS empapadas (por goteo) durante 15 minutos, incluso con un tiempo de vinculación sustancialmente menor de solo 1 minuto comparado con los 15 minutos asignados a la ACS empapadas ( $p < 0,0035$ ). Estos resultados inesperados y sorprendentes indican que el VIP aumenta la capacidad de vinculación de material rhBMP-2 con las ACS. Sin comprometerse con una teoría en particular, se estima que la rhBMP-2 se vincula mejor a las ACS utilizando el VIP que los métodos tradicionales de remojo porque el VIP facilita mayor vinculación por la exposición de rhBMP-2 a un número mayor de lugares de vinculación de colágeno dentro de las ACS.

## EXPERIMENTO 2

Un experimento similar fue realizado usando tejido de aloinjerto de hueso, en lugar de esponjas de ACS, para comprobar además que los anteriores resultados "sorprendentes e inesperados" no eran únicos de las esponjas de ACS. Se suministraron 150µg de rhBMP-2 (Infuse<sup>®</sup>, Medtronic, Inc., Memphis, TN) por centímetro cúbico de portador a múltiples ejemplos de tejido de aloinjerto óseo utilizando tanto un método de goteo (remojo) o a través del Contenedor de Infusión por Vacío (VIP). El rhBMP-2 aplicado por el método de goteo pudieron remojarse durante 15 minutos, mientras que las muestras en el VIP dispusieron de sólo 1 minuto para la vinculación. El rhBMP-2 no consolidado se enjuagó de las muestras de tejido de aloinjerto óseo colocándolo en solución salina excesiva en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora. Se utilizó un kit ELISA rhBMP-2 (Leinco Technologies, Inc., St. Louis, MO) para determinar la cantidad de rhBMP-2 vinculado a las muestras de tejido de aloinjerto óseo después del remojo de 1 hora. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA unidireccional ( $p < 0,05$ ) y una prueba post-hoc de diferencia significativa honesta de Tukey para comparaciones múltiples.

La FIG. 7 muestra las cantidades relativas de rhBMP-2 vinculadas a las muestras de tejido de aloinjerto óseo remojadas por goteo después de 15 minutos de tiempo de vinculación versus las muestras de hueso que habían tenido un 1 minuto de tiempo de infusión en el VIP. Como se muestra en la figura 7, las muestras de aloinjerto de hueso infundido en el VIP exhibieron mayor vinculación estadística de rhBMP-2 en comparación con las muestras de aloinjerto óseo que estuvieron en remojo 15 minutos (por goteo), incluso con un tiempo de vinculación sustancialmente menor de solo 1 minuto comparado con los 15 minutos asignados a las muestras remojadas de hueso. Estos sorprendentes e inesperados resultados aumentan capacidad de vinculación VIP de rhBMP-2 en materiales múltiples de matriz absorbente, no sólo en las esponjas ACS.

En una realización, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona una vinculación superior al 50% de los componentes biológicos a una matriz absorbente bioabsorbible en menos de 15 minutos a partir de la infusión. En otras realizaciones, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona una vinculación mayor del 50% de componentes biológicos a una matriz absorbente bioabsorbible en menos de 14, 13, 12, 11, 10,9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2 minutos de infusión y preferiblemente en un tiempo inferior o igual a 1 minuto de infusión.

En otras realizaciones, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona una vinculación superior al 75% de los componentes biológicos a una matriz absorbente bioabsorbible en menos de 15 minutos a partir de la infusión. En otras realizaciones, el conjunto de sistema de contenedor de implantes médicos infundido por vacío proporciona una vinculación mayor del 75% de componentes biológicos a una matriz absorbente bioabsorbible en menos de 14, 13, 12, 11, 10,9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2 minutos de infusión y preferiblemente en un tiempo inferior o igual a 1 minuto de infusión.

Los beneficios de la vinculación aumentada entre rh-BMP-2 y ACS en un ambiente VIP son inmediatos e identificables. Es muy deseable la fuerte vinculación de rhBMP-2 a las ACS porque ello disminuye la precipitación prematura de rhBMP-2 al exterior de injertos de matriz absorbente y en los tejidos circundantes, dentro del paciente. Se ha conocido, tal como se indicó anteriormente, la precipitación prematura o excesiva de BMPs que estimula el crecimiento ectópico óseo en tejido muscular y en casos más graves, relacionados con implantes en el área cervical de la columna vertebral, se ha descubierto crecimiento ectópico óseo hasta rodear completamente la tráquea del sujeto cerrando su paso de aire y causando asfixia.

REIVINDICACIONES

- 5           1. Un contenedor (300) para almacenar una matriz reabsorbible osteoconductiva que comprende una matriz absorbente bioabsorbible, contenedor que consta de:  
                     una cavidad interna mantenida bajo presión negativa, cavidad interna que consta de  
                             cámara recepción (320) configurada para recibir solución biológica y una cámara de  
                             almacenamiento configurada para almacenar la matriz reabsorbible osteoconductiva;  
                             **caracterizado porque** dicha cavidad interna incluye además un conjunto de canales  
                             (335) acoplando la cámara de recepción (320) y la cámara de almacenamiento (340),  
 10                   en donde el conjunto de canales está diseñado para dispersar la distribución de la solución  
                             biológica durante prácticamente el mismo tiempo todo a lo largo longitudinal de la matriz  
                             osteoconductiva reabsorbible una vez que la cámara de recepción del compartimiento recibe la  
                             solución biológica.
- 15           2. El contenedor de la reivindicación 1, en el que dicha matriz absorbente bioabsorbible consta de un matriz  
                     de colágeno.
- 20           3. El contenedor de la reivindicación 2, en donde dicho colágeno es seleccionado del grupo que consiste de  
                     colágeno Tipo I, colágeno Tipo II, colágeno Tipo IV, de colágeno concentrado-de-célula y combinaciones  
                     entre los mismos.
- 25           4. El contenedor de la reivindicación 2, en la cual dicha matriz de colágeno incluye una densidad de  
                     nanofibras de 10 nanofibras por 100 microm<sup>3</sup> de volumen de matriz de colágeno.
- 30           5. El contenedor de la reivindicación 1, en el cual la mencionada solución biológica incluye un material  
                     morfogenético de hueso, seleccionado del grupo formado por proteína morfogenética ósea (BMP), factor  
                     de transformación de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de diferenciación de crecimiento (GDF) y proteínas  
                     morfogenéticas derivados de cartílago (CDMP).
- 35           6. El contenedor de la reivindicación 5, en el cual se selecciona dicha proteína morfogenética hueso del  
                     grupo que incluye BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, 5-BMP, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10 y  
                     BMP-11.
- 40           7. El contenedor de la reivindicación 5, en donde dicha solución biológica incluye rh-BMP-2.
- 45           8. Un método de vinculación rápida de un componente biológico a un implante médico antes de la  
                     introducción en un individuo que necesite del mismo que incluye  
                             Proporcionar un contenedor (300) según la reivindicación 1 en donde dicho implante médico  
                             incluye la mencionada matriz absorbente bioabsorbible; e  
                             Introducir un componente biológico en dicha cámara de recepción (320) de dicho contenedor;  
                             donde dicho componente biológico está sustancialmente vinculado al mencionado implante.
- 50           9. El método de la reivindicación 8, en donde dicho componente biológico está vinculado más de un 50% a  
                     dicho implante.
- 55           10. El método de la reivindicación 8, en donde dicho componente biológico está vinculado más de un 75% a  
                     dicho implante.
- 60           11. El método de la reivindicación 8, donde dicha matriz absorbente bioabsorbible es una matriz de colágeno  
                     purificado.
- 65           12. El método de la reivindicación 11, en donde la mencionada matriz incluye un colágeno de tipo I  
                     compuesto por una densidad de nanofibras de 10 nanofibras por 100 microm<sup>3</sup> de volumen de matriz de  
                     colágeno.
13. El método de la reivindicación 8, en el cual dicho componente biológico incluye un material  
                     morfogenético óseo seleccionado del grupo que incluye proteína morfogenética ósea (BMP), factor de  
                     transformación de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de la diferenciación (GDF) y proteínas  
                     morfogenéticas derivadas de cartílago (CDMP).
14. El método de la reivindicación 13, en donde se selecciona dicha proteína morfogenética de hueso del  
                     grupo que incluye BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10 y  
                     BMP-11.
15. El método de la reivindicación 8, en el cual dicho implante es un injerto de hueso.

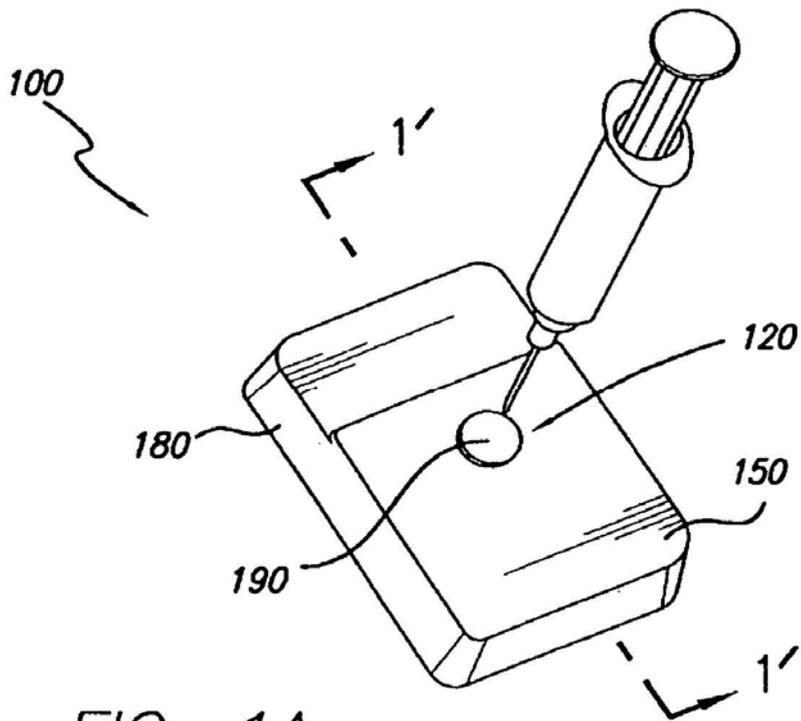


FIG. 1A

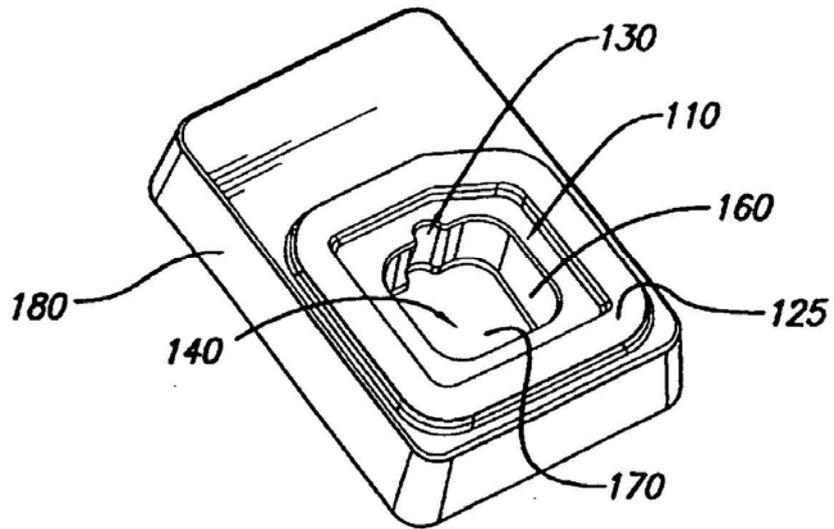


FIG. 1B

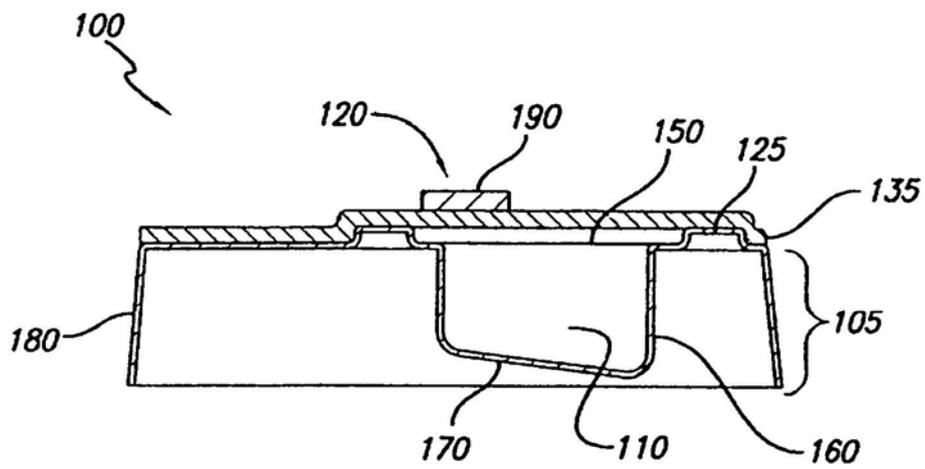


FIG. 1C

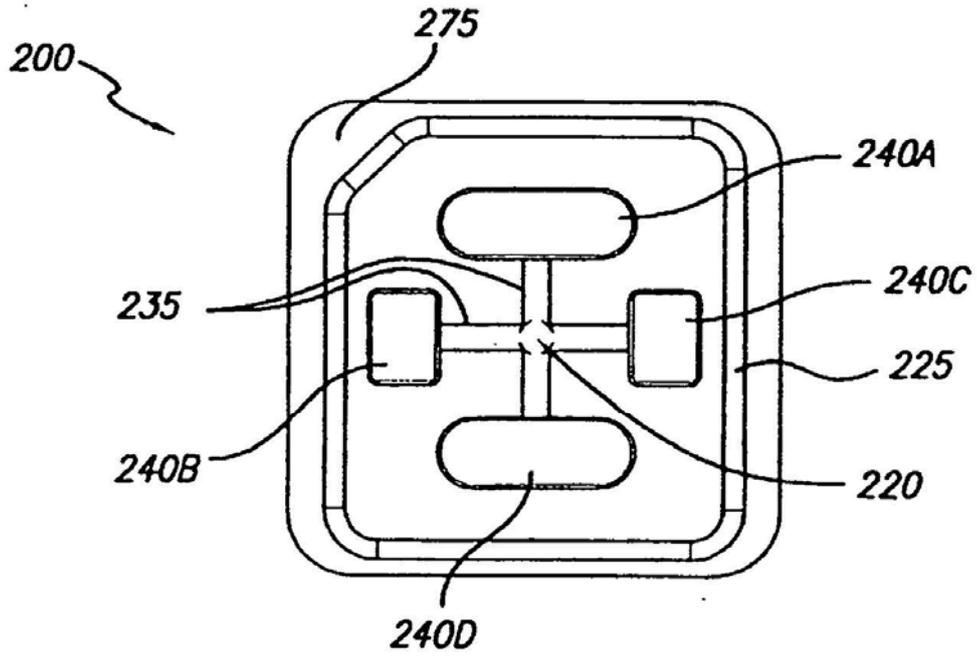


FIG. 2A

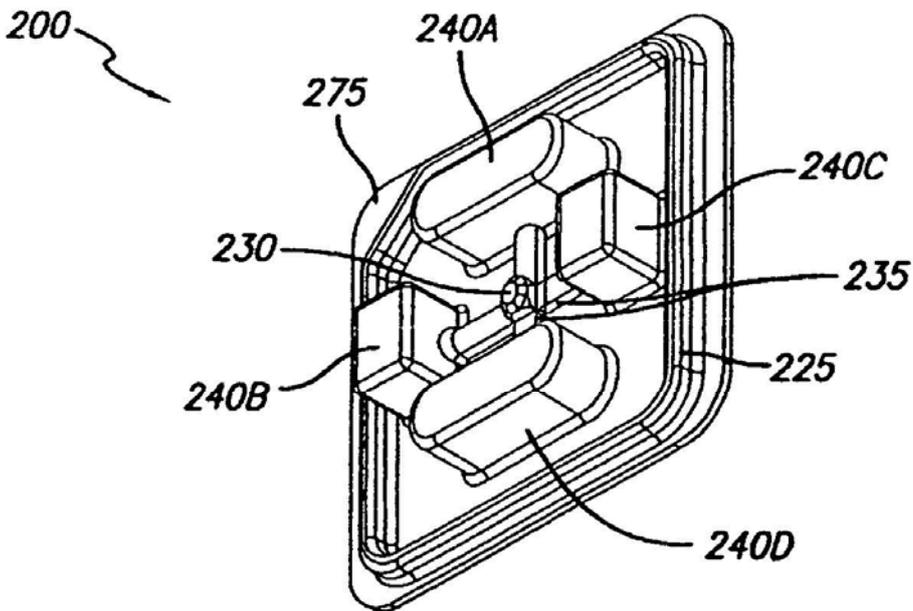


FIG. 2B

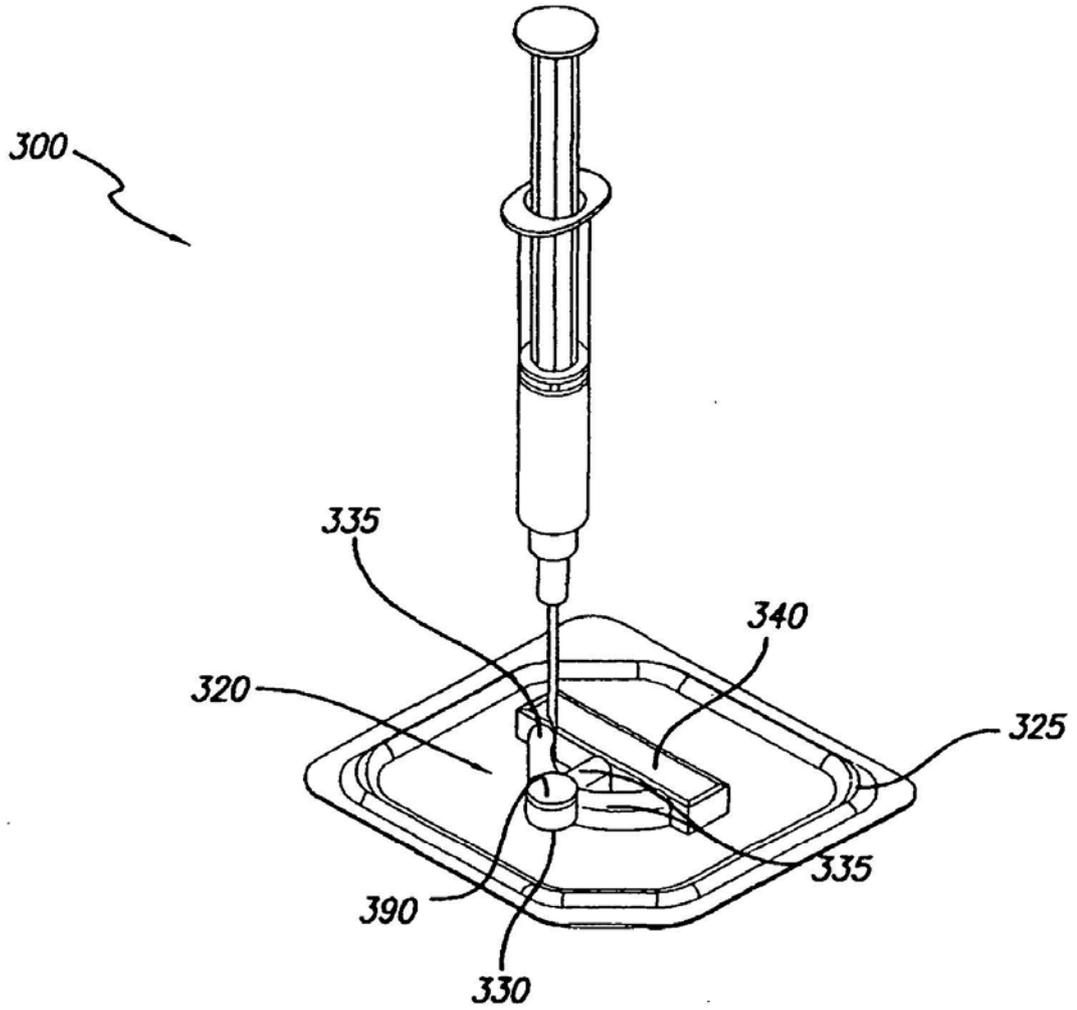


FIG. 3

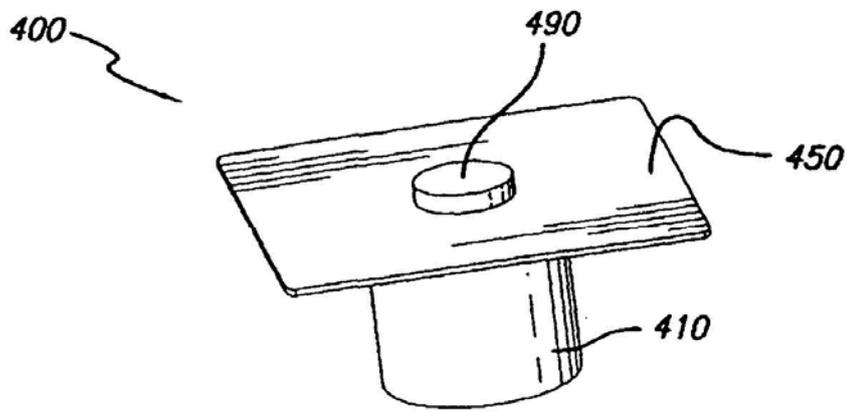


FIG. 4A

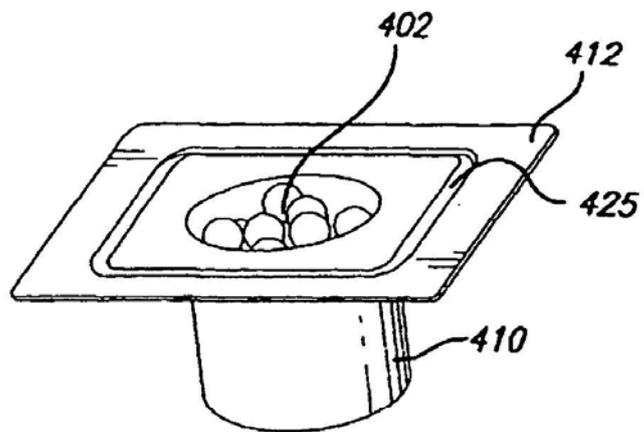
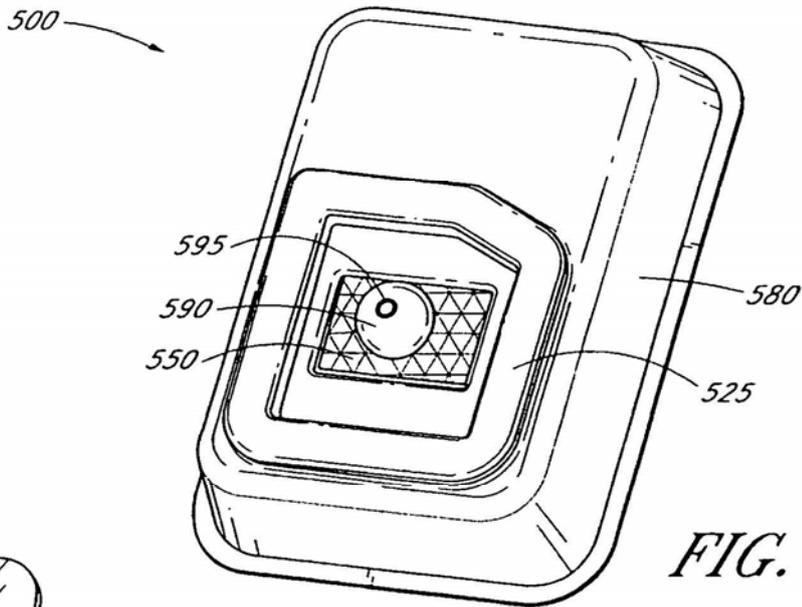
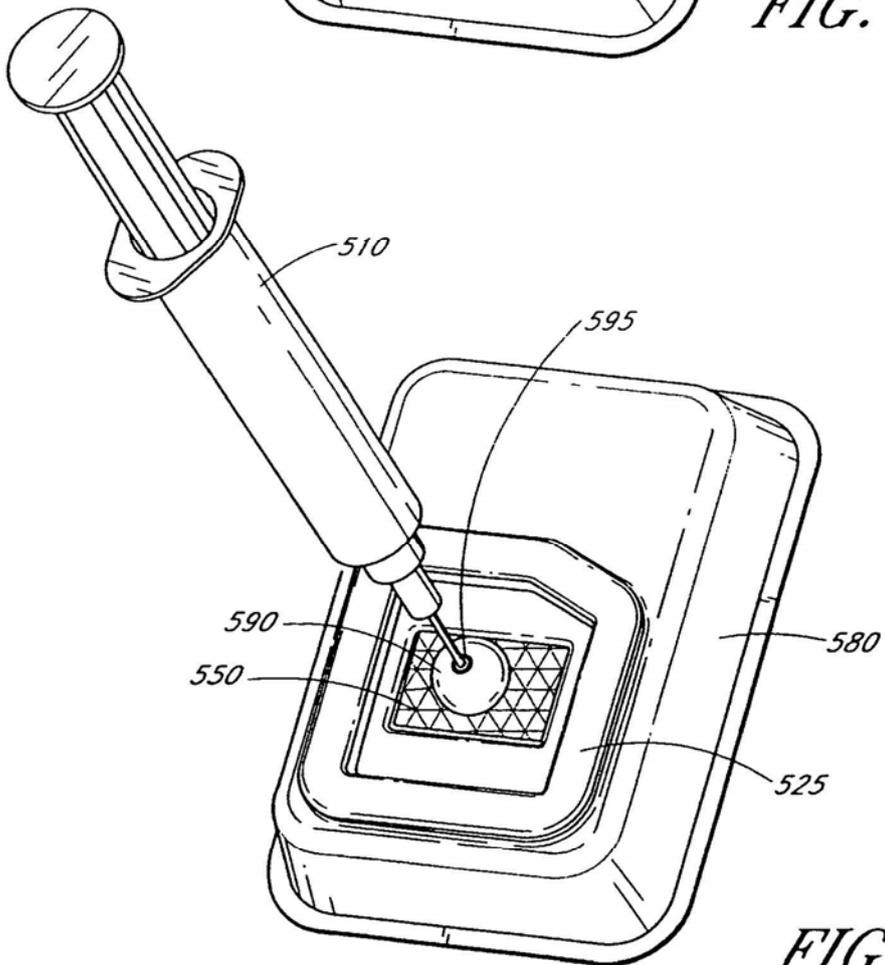


FIG. 4B



*FIG. 5A*



*FIG. 5B*

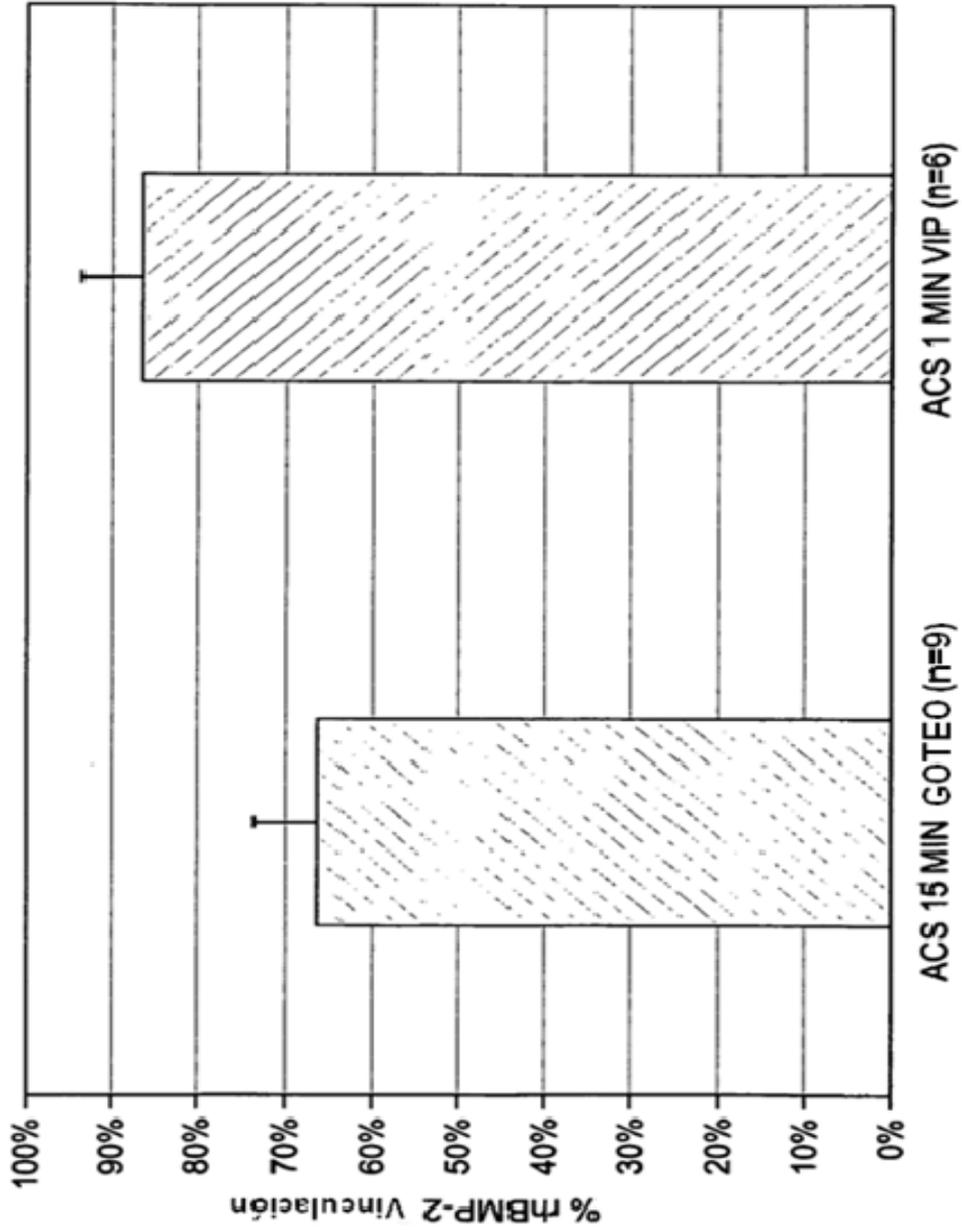


FIG. 6

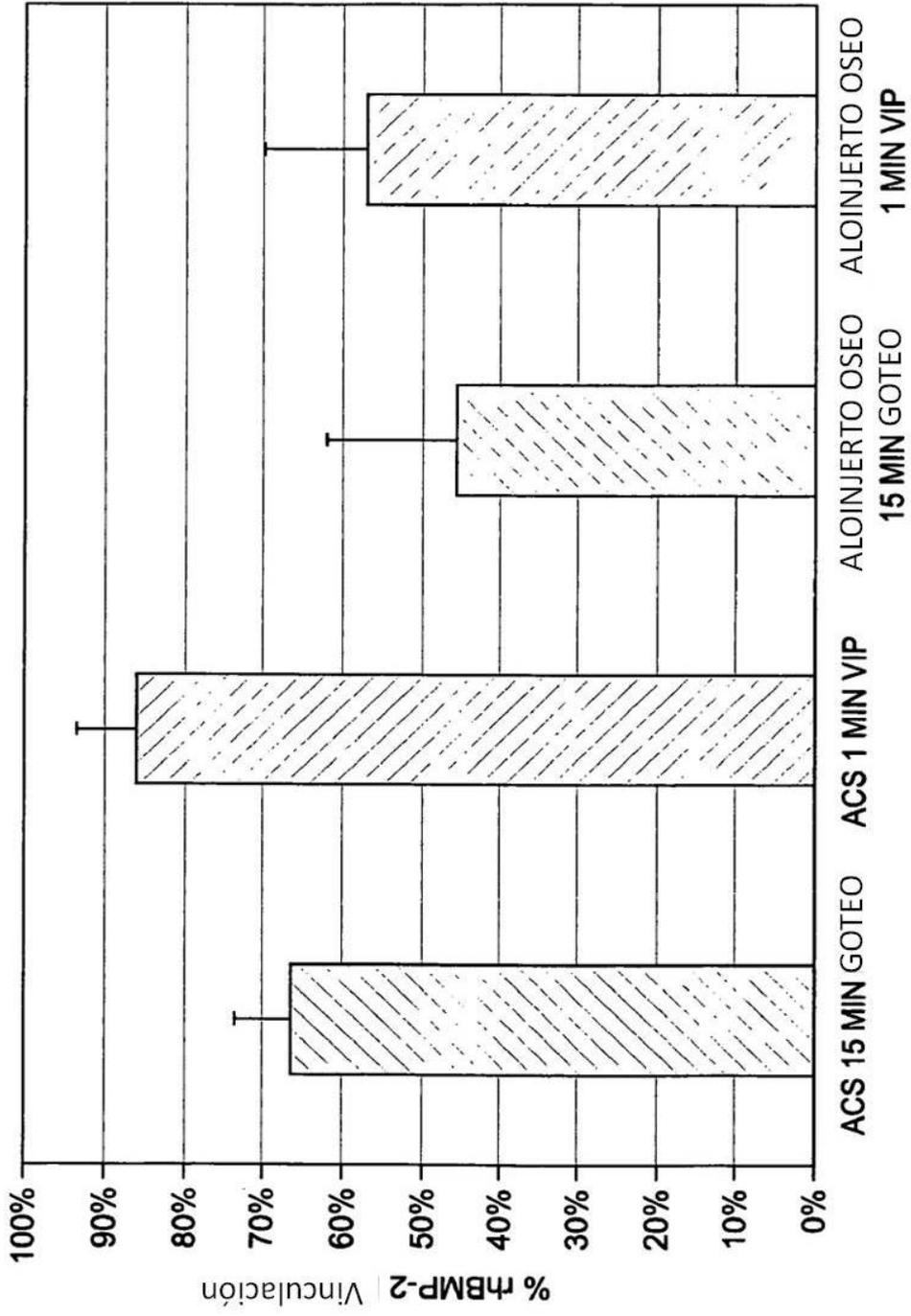


FIG. 7