

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 544**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2008 E 08838595 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2211921**

54 Título: **Composiciones de matrices óseas desmineralizadas y métodos**

30 Prioridad:

19.10.2007 US 981395 P

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

10.03.2014

73 Titular/es:

**WARSAW ORTHOPEDIC, INC. (100.0%)
2500 Silveus Crossing
Warsaw, IN 46581, US**

72 Inventor/es:

**BEHNAM, KEYVAN;
WEI, GUOBAO y
BEISSER, JAMES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 446 544 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

Composiciones de matrices óseas desmineralizadas y métodos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a composiciones de matrices óseas y más específicamente a una matriz ósea desmineralizada que tiene una capacidad osteoinductora acrecentada y a métodos para su producción

Antecedentes

10 Se sabe que el tejido óseo de los mamíferos contiene uno o más materiales proteínicos, presumiblemente activos durante el crecimiento y la curación natural del hueso, que pueden inducir una cascada de desarrollo de sucesos celulares que dan lugar a la formación de hueso endocronal. Los factores activos se han referido de manera variada en la bibliografía como proteínas morfogenéticas o morfogénicas del hueso (BMPs), proteínas inductoras del hueso, factor o factores del crecimiento del hueso, proteínas osteogénicas o proteínas osteoinductoras. Estos factores activos son colectivamente denominados en la presente memoria como factores osteoinductores.

15 Los factores osteoinductores están presentes dentro de la estructura mixta del hueso cortical y están presentes en concentraciones muy bajas, por ejemplo 0,003%. Los factores osteoinductores dirigen la diferenciación de células mesenquimales pluripotentes en células osteoprogenitoras que forman osteoblastos. En base al trabajo de Marshall Urist que se muestra en la Patente de EE.UU. nº 4.294.753, expedida el 13 de octubre de 1981, la adecuada desmineralización del hueso cortical expone los factores osteoinductores, haciéndolo osteoinductor, como se trata más completamente más adelante.

Visión general de injertos óseos

20 La reparación rápida y efectiva de los defectos óseos provocados por lesiones, enfermedades, heridas o cirugía es un objetivo de la cirugía ortopédica. Con este fin se han usado o propuestos varias composiciones y materiales para usar en la reparación de los defectos óseos. Las propiedades biológicas, físicas y mecánicas de las composiciones y materiales están entre los principales factores que influyen en su idoneidad y eficacia en varias aplicaciones ortopédicas.

25 El hueso autólogo esponjoso ("ACB"), también conocido como hueso autógeno o autoinjertado, se considera el patrón oro de los injertos óseos. ACB es osteoinductor e inmunógeno y, por definición, tiene todas las características estructurales y funcionales apropiadas para el receptor particular. Desafortunadamente, ACB está sólo disponible en un número limitado de circunstancias. Algunos individuos carecen de ACB de dimensiones y calidad apropiadas para trasplantar, y el dolor y la morbilidad del sitio donante pueden plantear serios problemas para los pacientes y sus médicos.

30 Las aplicaciones de los injertos óseos pueden diferenciarse por los requisitos del sitio esquelético. Ciertas aplicaciones requieren un "injerto estructural" en el cual un papel del injerto es proporcionar soporte mecánico o estructural al sitio. Tales injertos contienen una porción sustancial de tejido óseo desmineralizado para proporcionar la resistencia necesaria para soportar la carga. Ejemplos de aplicaciones que requieren un "injerto estructural" incluyen injertos intercalares, fusión espinal, fusión de articulaciones, reconstrucciones de huesos largos, etc. Otras aplicaciones requieren un "injerto osteogénico" en el cual un papel de injerto es potenciar o acelerar el crecimiento de nuevo tejido óseo. Ejemplos de aplicaciones que requieren un "injerto osteogénico" incluyen el llenado de carencias, la fusión espinal, la fusión de articulaciones, etc. Los injertos también pueden tener otras propiedades biológicas beneficiosas tales como, por ejemplo, servir como soportes de administración de sustancias bioactivas.

35 40 Las sustancias bioactivas incluyen sustancias fisiológica o farmacológicamente activas que actúan local o sistémicamente en el huésped.

45 Las propiedades biomédicas de los osteoimplantes tras el implante están determinadas por muchos factores, que incluyen el sitio específico del que se extrae el hueso usado para realizar el osteoimplante; varias características físicas del tejido donante; y el método escogido para preparar, conservar y almacenar el hueso antes del implante, así como el tipo de carga a la que se somete el injerto.

50 Se ha invertido mucho esfuerzo para identificar y desarrollar materiales alternativos para injertos óseos. Urist publicó artículos seminales sobre la teoría de la inducción ósea y un método para descalcificar el hueso, es decir, para fabricar matrices óseas desmineralizadas (DBM). Urist M.R., Bone Formation by Autoinduction, Science 1965; 150 (698): 893-9; Urist M.R. et al., The Bone Induction Principle, Clin. Orthop. Rel. Res. 53: 243-283, 1967. La DBM es un material osteoinductor porque induce el crecimiento óseo cuando se implanta en un sitio ectópico de un roedor, al menos parcialmente debido a los factores osteoinductores contenidos dentro de DBM. Honsawek et al. (2000). Ahora se sabe que hay numerosos factores osteoinductores, por ej., BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, los cuales son parte de la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta (TGF-beta) (Kawabata et al., 2000). BMP-2 ha llegado a ser el más importante y ampliamente estudiado de la familia de proteínas BMP. También hay otras

proteínas presentes en la DBM que no son autoinductoras solas pero que aún contribuyen al crecimiento óseo, que incluyen el factor-2 de crecimiento de los fibroblastos (FGF-2), los factores de crecimiento I y II semejantes a la insulina (IGF-I e IGF-II), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta I (TGF-beta I) (Hauschka, et al. 1986; Canalis, et al, 1988; Mohan et al. 1996).

5 Por consiguiente, una técnica conocida para promover el proceso de incorporación de osteoimplantes es la desmineralización sobre las superficies externas, las superficies internas, o el volumen entero del implante. El proceso de desmineralización de injertos óseos es bien conocido. A este respecto, véanse Lewandrowski et al., *J. Biomed. Materials Res.*, 31, pp. 365 372 (1996); Lewandrowski et al., *Calcified Tiss. Int.*, 61, pp. 294 297 (1997); Lewandrowski et al., *J. Ortho. Res.*, 15, pp. 748 756 (1997).

10 Se ha informado que los implantes de DBM son particularmente útiles (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n°s 4.394.370, 4.440.750, 4.485.097, 4.678.470, y 4.743.259; Mulliken *et al.*, *Calcif. Tissue Int.* 33: 71, 1981; Neigel *et al.*, *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.* 12: 108, 1996; Whiteman *et al.*, *J. Hand. Surg.* 18B: 487, 1993; Xiaobo *et al.*, *Clin. Orthop.* 293: 360, 1993. Típicamente, la DBM se deriva de cadáveres. El hueso se separa asépticamente y se trata para matar cualquier agente infeccioso. El hueso es reducido a partículas por molturación o molienda, y a
15 continuación el componente mineral se extrae por varios métodos, tales como por inmersión del hueso en una disolución ácida. La matriz que permanece es maleable y puede procesarse y/o formarse y conformarse adicionalmente para implantar en un sitio particular en el receptor. Las partículas o fibras óseas desmineralizadas pueden formularse con excipientes biocompatibles para reforzar las propiedades de manipulación quirúrgica y la conformabilidad al defecto o sitio quirúrgico. El hueso desmineralizado preparado de esta manera contiene una
20 variedad de componentes que incluyen proteínas, glicoproteínas, factores de crecimiento y proteoglicanos. Tras el implante, la presencia de DBM induce el reclutamiento celular hacia el sitio o lesión. Las células reclutadas pueden finalmente diferenciarse en células formadoras de hueso. Tal reclutamiento de células conduce a un aumento de la velocidad de curado de la herida y, por lo tanto, a una recuperación más rápida del paciente.

25 El documento US 2003/039676 A1 describe osteoimplantes osteoinductores basados en DBM. El osteoimplante porta una carga. La DBM se obtiene de hueso cortical derivado de diáfisis (huesos largos). Están presentes soportes/soportes y factores de crecimiento (BMP).

Breve resumen

La presente invención proporciona una composición para matriz ósea desmineralizada derivada de hueso cortical que comprende una capa perióstica, una capa media y una capa endóstica, composición que comprende un
30 porcentaje desproporcionado de hueso cortical derivado de la capa perióstica, donde el porcentaje desproporcionado derivado de la capa perióstica es una cantidad de hueso de la capa perióstica que excede de la cantidad esperada si se moliera el hueso entero, y donde la matriz ósea desmineralizada está sustancialmente exenta de hueso derivado de la capa endóstica.

35 Se proporcionan composiciones de matrices óseas y, más específicamente, una matriz ósea desmineralizada (DBM) que tiene una capacidad osteoinductora acrecentada y métodos para su producción. El periostio es una capa de tejido conjuntivo que reviste la superficie del tejido óseo que forma la cavidad medular de los huesos largos. Por consiguiente, a la capa de hueso externa/perióstica se la puede denominar como la capa perióstica de hueso y a la
40 capa de hueso interna/endóstica se la puede denominar como la capa endóstica de hueso. Se proporciona DBM derivada de hueso cortical de la capa de hueso perióstica. Se describen preparaciones de y métodos para usar composiciones DBM de la capa de hueso perióstica.

Como se describe en la presente memoria, se proporciona una composición para aloinjertos que comprende matriz ósea desmineralizada donde la matriz ósea desmineralizada está compuesta de un porcentaje desproporcionado de hueso cortical derivado de una capa perióstica.

45 Según una realización, se proporciona una composición de matriz ósea desmineralizada que comprende un porcentaje desproporcionado de hueso derivado de hueso de una capa perióstica. La composición de matriz ósea desmineralizada no tiene ningún factor de crecimiento exógeno o ningún extracto de DBM. La composición de matriz ósea desmineralizada tiene un contenido de factor autoinductor mayor que la matriz ósea desmineralizada que comprende hueso derivado de fuentes de capas no periósticas.

50 Según otra realización, se proporciona un método para producir una composición osteoinductora. El método comprende obtener hueso cortical que comprende un porcentaje desproporcionado de hueso desmineralizado de una capa perióstica y desmineralizar el hueso cortical.

55 Según aún otra realización, se proporciona un método para producir una composición osteoinductora que comprende moler hueso de una capa perióstica, moler hueso de una capa media, y moler hueso de una capa endóstica. El hueso molido de la capa perióstica se separa y desmineraliza. Se forma una composición con el hueso desmineralizado de la capa perióstica y tiene una cantidad desproporcionada de hueso de la capa perióstica.

Cuando en la presente memoria los valores numéricos se expresan como un intervalo, los puntos extremos están incluidos.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIG. 1a ilustra una sección transversal de un hueso largo que muestra la capa perióstica, capa media y capa endóstica de hueso cortical.

La FIG. 1b ilustra una sección transversal de un hueso largo que muestra la capa perióstica, capa media y capa endóstica de hueso cortical con capas proporcionadas entre las mismas.

La FIG. 1c ilustra una sección transversal de un hueso largo que tiene porciones separadas de las superficies periósticas, según una realización.

10 La FIG. 2 ilustra micrografías de rayos X de un colágeno que muestran la mineralización de fibras recogidas de cada capa del hueso cortical ilustrado en la FIG. 1 en ratas atímicas.

La FIG. 3 ilustra un histograma que compara el volumen total de minerales del hueso inducido por cada preparación en sitios heterotópicos.

15 La FIG. 4 ilustra un histograma que compara el porcentaje de volumen total de minerales del hueso a volumen total de nódulos por cada preparación en sitios heterotópicos.

La FIG. 5 ilustra una tabla que muestra los resultados de una evaluación histológica para cada preparación.

La FIG. 6 ilustra un histograma que compara la cantidad de un factor osteoinductor BMP-2 en cada preparación.

Definiciones

20 Como se usa en la presente memoria, *agente bioactivo o compuesto bioactivo* se refiere a un compuesto o entidad que altera, inhibe, activa o de otra forma afecta a sucesos químicos o biológicos. Por ejemplo, los agentes bioactivos pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas o péptidos osteogénicos o condrogénicos, sustancias anti SIDA, sustancias anticancerosas, antibióticos, inmunodepresores, sustancias antivíricas, inhibidores de enzimas, hormonas, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistaminas, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias anti-Parkinson, antiespasmódicos y agentes para la contracción muscular que incluyen agentes bloqueantes de los canales, mitóticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparásitos y/o antiprotozoos, moduladores de las interacciones célula-matriz extracelular que incluyen inhibidores del crecimiento celular y moléculas antiadhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores del DNA, RNA o síntesis de proteínas, antihipertensores, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides, factores antiangiogénicos, factores angiogénicos, factores antisecretantes, agentes anticoagulantes y/o antitrombóticos, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos y agentes de formación de imágenes. En ciertas realizaciones, el agente bioactivo es un fármaco. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es un factor de crecimiento, una citoquina, una molécula de la matriz extracelular o un fragmento derivado de la misma, por ejemplo, una secuencia de unión celular tal como RGD, la abreviatura de la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico. Un listado más completo de agentes bioactivos y fármacos específicos adecuados para usar en la presente invención puede encontrarse en "Pharmaceutical Substances: Synthesis, Patents, Applications" de Axel Kleeman y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999; the "Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", edited by Susan Budavari *et al.*, CRC Press, 1996; y la United States Pharmacopeia-25/National Formulary-20, publicada por la United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville MD, 2001.

40 Como se usa en la presente memoria, *biocompatible* describe materiales que, tras la administración *in vivo*, no inducen efectos indeseables a largo plazo.

Como se usa en la presente memoria, *hueso* se refiere a hueso que es de origen cortical, esponjoso, cortico-esponjoso de autógeno, alogénico, exogénico o transgénico.

45 Como se usa en la presente memoria, *desmineralizado* se refiere a cualquier material generado separando material mineral de tejido, por ej., tejido óseo. En ciertas realizaciones, las composiciones desmineralizadas descritas en la presente memoria incluyen preparaciones que contienen menos que 5% de calcio. En algunas realizaciones, las composiciones desmineralizadas pueden comprender menos que 1% de calcio en peso. Se pretende que hueso parcialmente desmineralizado se refiera preparaciones con más que 5% de calcio en peso pero que contienen menos que 100% de la cantidad original de calcio. En algunas realizaciones, hueso desmineralizado tiene menos que 95% de su contenido mineral original. Se pretende que "desmineralizado" englobe expresiones tales como "sustancialmente desmineralizado", "parcialmente desmineralizado", "superficialmente desmineralizada" y "completamente desmineralizado". Se pretende que "parcialmente desmineralizado" englobe "superficialmente

desmineralizada”.

5 Como se usa en la presente memoria, *matriz ósea desmineralizada* (DBM) se refiere a cualquier material generado separando material mineral de tejido óseo. En algunas realizaciones, las composiciones de DBM que se usan en la presente memoria incluyen preparaciones que contienen menos que 5% de calcio y, en algunas realizaciones menos que 1% de calcio en peso. En otras realizaciones, las composiciones de DBM comprenden hueso parcialmente desmineralizado (por ej., preparaciones con más que 5% de calcio en peso pero que contienen menos que 100% de la cantidad original de partida de calcio).

Como se usa en la presente memoria, *osteoconductor* se refiere a la capacidad de una sustancia para servir como plantilla o sustancia junto con la cual el hueso puede crecer.

10 Como se usa en la presente memoria, *osteogénico* se refiere a materiales que contienen células vivas capaces de diferenciación en el tejido óseo.

Como se usa en la presente memoria, *osteoimplante* se refiere a cualquier implante preparado según realizaciones descritas en la presente memoria y, por lo tanto, puede incluir expresiones tales como membrana ósea, injerto óseo, etc.

15 Como se usa en la presente memoria, *osteoinductor* se refiere a la cualidad de ser capaz de reclutar células del huésped que tienen potencial para estimular la formación de hueso nuevo. Cualquier material que pueda inducir la formación de hueso ectópico en el tejido blando de un animal se considera osteoinductor. Por ejemplo, la mayor parte de los materiales osteoinductores inducen formación de hueso en ratas atímicas cuando se ensayan según el método de Edwards et al., "Osteoinduction of Human Demineralized Bone: Characterization in a Rat Model," *Clinical Orthopaedics & Rel. Res.*, 357: 219-228, diciembre 1998. En otros casos, se considera que la osteoinducción ocurre a través del reclutamiento celular y de la inducción de las células reclutadas a un fenotipo osteogénico. La puntuación de osteoinductividad se refiere a una puntuación que varía de 0 a 4 que se determina según el método de Edwards et al. (1998), o un ensayo equivalente calibrado. En el método de Edwards et al., una puntuación de "0" representa que no se forma hueso; "1" representa 1%-25% de implante implicado en la formación de hueso nuevo; "2" representa 26-50% de implante implicado en la formación de hueso nuevo; "3" representa 51%-75% de implante implicado en la formación de hueso nuevo; y "4" representa > 75% de implante implicado en la formación de hueso nuevo. En algunos casos, la puntuación se evalúa 28 días después del implante. Sin embargo, la puntuación de osteoinductividad puede obtenerse en tiempos menores tales como 7, 14 ó 21 días tras el implante. En estos casos, puede ser deseable incluir una DBM testigo deseable tal como DBM en polvo sin un soporte y, si es posible, un testigo positivo tal como BMP. Ocasionalmente, la osteoinductividad también puede calificarse a tiempos mayores tales como 40, 60 ó incluso 100 días tras el implante. El porcentaje de osteoinductividad se refiere a una puntuación de osteoinductividad en un momento dado expresada como un porcentaje de actividad, de una puntuación de referencia especificada. La osteoinductividad puede evaluarse en una rata atímica o en un ser humano. En general, como se trata en la presente memoria, la puntuación de osteoinductividad se evalúa en base a la osteoinductividad en una rata atímica.

40 Como se usa en la presente memoria, *agente estabilizante* se refiere a cualquier entidad química que, cuando se incluye en una composición que comprende matriz ósea y/o un factor de crecimiento, refuerza la osteoinductividad de la composición que se mide frente a una muestra de referencia especificada o cualquier entidad que prolongue la vida durante el almacenamiento de la DBM en comparación con soportes hidratados. En la mayoría de los casos, la muestra de referencia no contendrá el agente estabilizante, pero en todos los demás aspectos será la misma que la composición con agente estabilizante. El agente estabilizante también tiene en general poca o ninguna osteoinductividad por sí mismo y funciona aumentando la vida media de una o más de las entidades activas dentro de la composición en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de agente estabilizante, o prolongando o retrasando la liberación de un factor activo. En ciertas realizaciones, el agente estabilizante puede actuar proporcionando una barrera entre las proteasas y las enzimas que degradan los azúcares protegiendo de este modo los factores osteoinductores encontrados en o sobre la matriz por degradación y/o liberación. En otras realizaciones, el agente estabilizante puede ser un compuesto químico que inhibe la actividad de las proteasas o de las enzimas que degradan los azúcares. En algunas realizaciones, el agente estabilizante retarda el acceso de las enzimas conocidas para liberar y solubilizar los factores activos. La vida media puede determinarse mediante un ensayo inmunológico o enzimático de un factor específico, unido a la matriz o extraído de la misma. Alternativamente, la medida de un aumento de la vida media de la osteoinductividad, o la medida de la aparición acrecentada de productos del proceso autoinductor (por ej., células óseas, del cartílago u osteogénicas, productos o indicadores de las mismas) es un indicador útil de los efectos estabilizantes de una composición de matriz osteoinductora reforzada. La medida de la aparición prolongada o retrasada de una fuerte respuesta osteoinductora será en general indicativa de un aumento de la estabilidad de un factor acoplado con un desenmascaramiento retrasado del factor de actividad.

Como se usa en la presente memoria, *superficialmente desmineralizado* se refiere a elementos derivados del hueso que al menos poseen aproximadamente 90 por ciento en peso de su contenido mineral inorgánico original, la

expresión “parcialmente desmineralizado”, como se usa en la presente memoria, se refiere a elementos derivados del hueso que poseen de aproximadamente 8 a aproximadamente 90 por ciento en peso de su contenido mineral inorgánico original, y la expresión “completamente desmineralizado”, como se usa en la presente memoria, se refiere a hueso que contiene menos que 8% de su contenido mineral inorgánico original.

5 Descripción detallada

Se proporcionan hueso cortical perióstico molido y composiciones e implantes que comprenden hueso cortical perióstico molido y, en algunas realizaciones, hueso cortical endóstico molido, y métodos para su producción. El periostio es una capa de membrana de tejido conjuntivo que cubre la superficie externa del hueso. El endostio es una capa de tejido conjuntivo que reviste la superficie del tejido óseo que forma la cavidad medular de los huesos largos. Por consiguiente, la capa externa del hueso puede denominarse como capa perióstica de hueso y la capa interna del hueso puede denominarse como capa endóstica del hueso. Una porción de hueso está presente entre la capa perióstica del hueso y la capa endóstica del hueso. Esta porción puede denominarse como una o más capas medias. Se describen preparaciones de y métodos para el uso de composiciones de DBM y, más específicamente, composiciones de DBM que comprenden un porcentaje desproporcionado de hueso de la capa perióstica de hueso y/o de la capa media de hueso.

El hueso molido obtenido de diferentes capas de hueso largo cortical tiene diferentes grados de capacidades osteoinductoras. Con referencia a la FIG. 1a, el hueso molido de la capa perióstica 12 de hueso cortical 10 tiene mayores capacidades osteoinductoras en comparación con el hueso molido de las capas medias 14 y la capa endóstica 16 de hueso cortical 10. Por consiguiente, cuando se usa hueso perióstico para preparar matriz ósea desmineralizada (DBM), la capacidad osteoinductora de la DBM derivada del periostio es mayor que la de la DBM preparada con DBM derivada del endostio o mediostio o que la de la mixta. Se describen preparaciones de y métodos para preparar y usar tales composiciones de DBM derivadas del periostio.

El hueso cortical es un material compuesto de zonas de crecimiento que son reconstituidas, reordenadas y relocalizadas durante el crecimiento y las continuas alteraciones de remodelación. Los tejidos óseos, incluyendo los depósitos endósticos y periósticos, migran con la edad y la remodelación del hueso. Como se trata en *Principles of Bone Remodeling*, el crecimiento transcurre en longitud por reemplazamiento del hueso endocondral del cartílago epifiseal proliferante. El hueso intermembránico del córtex, tanto endóstico como perióstico, mantiene el ritmo en dirección longitudinal así como lateral con este crecimiento lineal de la placa de cartílago. *Donald H. Enlow, Ph.D., Principles of Bone Remodeling, 109-112 (Charles C. Thomas, 1963).*

Como se describe en la presente memoria, se proporciona una composición de DBM que se deriva sustancialmente de hueso de la capa externa/perióstica de hueso cortical. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende una mezcla de partículas de DBM preparadas con hueso derivado de la capa externa/perióstica de hueso cortical y fibras de DBM preparadas con hueso derivado de la capa interior/endóstica y/o de la capa media de hueso cortical. En otras realizaciones, se proporciona una composición que comprende una mezcla de fibras de DBM preparadas con hueso derivado de la capa externa/perióstica de hueso cortical y partículas superficialmente desmineralizadas preparadas con hueso derivado de las capas interna y/o medias de hueso cortical. En algunas realizaciones, se proporciona una composición de DBM sustancialmente exenta del hueso cortical derivado de la capa endóstica. Además, en algunas realizaciones, las partículas óseas pueden dividirse en partículas obtenidas de la capa endóstica y partículas obtenidas de otras fuentes, donde las partículas obtenidas de la capa endóstica se usan para aplicaciones en las que la osteoinductividad es deseable, y las partículas obtenidas de otras fuentes se usan para otras aplicaciones.

En varias realizaciones, se proporciona una composición o producto que comprende un porcentaje desproporcionado de hueso de la capa perióstica. Una cantidad desproporcionada de hueso de cualquier capa dada es una cantidad de hueso de esa capa que supera la cantidad que sería de esperar si se moliera el hueso entero. Este valor, en algunas realizaciones, puede considerarse como una relación de hueso de esa capa a hueso de las otras capas. En algunas realizaciones, puede considerarse que un hueso completo comprende tres capas. Cuando se considera que un hueso completo comprende aproximadamente un tercio de capa endóstica, aproximadamente un tercio de capa media y aproximadamente un tercio de capa perióstica, descritas más completamente más adelante, si el hueso completo se moliera sería de esperar que aproximadamente un tercio del hueso molido fuera de la capa perióstica. Por tanto, según algunas realizaciones, puede proporcionarse una composición o producto que comprenda con una cantidad desproporcionada de hueso de la capa perióstica, o en exceso de aproximadamente un tercio del hueso de la capa perióstica. Según algunas realizaciones, puede proporcionarse una composición o producto que comprenda una cantidad desproporcionada de hueso de las capas perióstica y media, o en exceso de aproximadamente dos tercios del hueso de la capa perióstica y de la capa media. En aún otras realizaciones, una composición o producto que comprende una cantidad desproporcionada de hueso no de la capa endóstica.

En algunas realizaciones, la composición de DBM puede incluir compuestos o composiciones que potencian el crecimiento, tales como extracto TGF-beta, extracto de mineral óseo, extracto derivado de tejido, hormonas

peptídicas y sus combinaciones. En otras realizaciones, la composición de DBM puede incluir factores de crecimiento tales como citoquinas, hormonas peptídicas, proteínas minerales óseas, y semejantes. En otras realizaciones, la composición de DBM puede incluir excipientes y/o soportes. Tales excipientes y soportes pueden incluir, por ejemplo, citrato de acetiltriethyl (ATEC), citrato de acetiltri-n-butilo (ATBC), aspartamo y lactosa, alginatos, carbopol, carragenano, lactosa, lactato de laurilo, metil celulosa, goma guar, poli(acetato ftalato de vinilo), goma xantano, y similares.

I. Introducción

Se han identificado varios factores endógenos que juegan papeles en el desarrollo y/o reparación del hueso y/o del cartílago. Las BMPs tales como BMP-2 y BMP-4 inducen la diferenciación de células mesenquimales hacia células del linaje osteoblástico, aumentando de este modo el conjunto de células maduras, y también acrecientan las funciones características de los osteoblastos diferenciados. Canalis *et al.*, *Endocrine Rev.* 24(2): 218-235, 2003. Además, las BMPs inducen la osificación endocondral y la condrogénesis. Las BMPs actúan enlazándose a receptores específicos, lo cual da lugar a la fosforilación de una clase de proteínas denominadas SMADs. Las SMADs activadas entran en el núcleo, en el que regulan la transcripción de genes diana particulares. Las BMPs también activan rutas independientes de las SMAD tales como las que implican la transmisión de señales de la ruta Ras/MAPK. Al contrario que la mayoría de las BMPs, tales como BMP-2 y BMP-4, ciertas BMPs (por ej., BMP-3) actúan como reguladores negativos (inhibidores) de la osteogénesis. Además, BMP-1 es distinta, tanto estructuralmente como en términos de su mecanismo de acción, de otras BMPs, las cuales son miembros de la superfamilia TGF- β . Al contrario que otras BMPs (por ej., BMP-2, BMP-4), BMP-1 no es osteoinductora. En lugar de eso, BMP-1 es una proteína colagenolítica que también se ha demostrado que escinde la cordina (un inhibidor endógeno de BMP-2 y BMP-4). Toloid es una metaloproteasa que está estructuralmente relacionada con BMP-1 y tiene actividad proteolítica hacia la cordina. Véase Canalis, anteriormente, para más detalles con respecto a las actividades de BMPs y sus papeles en la osteogénesis y la condrogénesis.

Recientemente se ha estudiado el papel de las hormonas peptídicas en la regeneración y crecimiento del colágeno y del hueso. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. Publicación nº 20060247156. Tales hormonas, que incluyen, por ejemplo, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), colecistoquinina (CCK), dinorfina, encefalina, galanina, neuropéptido Y (NPY), neurotensina, somatostatina, sustancia P (SP), hormona liberadora de tiotropina (TRH), péptido intestinal vasoactivo (VIP), se identificaron originalmente debido a sus acciones neurogénicas, sin embargo, se ha encontrado que muchos neuropéptidos tienen acciones anabólicas, osteogénicas y/o condrogénicas.

Se han descubierto una variedad de inhibidores endógenos de BMPs además de la cordina. Estas proteínas actúan como antagonistas de BMPs e incluyen pseudo-receptores (por ej., Bambi) que compiten con los receptores de la transmisión de señales, SMADs inhibidores que bloquean la transmisión de señales, proteínas enlazantes intracelulares que se enlazan a SMADs activantes, factores que inducen la ubiquitinación y proteólisis de SMADs activantes, y proteínas extracelulares que se enlazan a BMPs e impiden su enlace a los receptores de la transmisión de señales. Entre las proteínas extracelulares están la noggina, cordina, folistatina, miembros de la familia Dan/Cerberus, y gastrulación torcida.

II. Composiciones osteoinductoras implantables de DBM

Se proporcionan una composición implantable osteoinductora de DBM y métodos para preparar tal composición. Como se ilustra en los ejemplos contenidos en la presente memoria, la DBM derivada de hueso largo cortical y extraída de la capa perióstica tiene una actividad biológica acrecentada cuando se compara con DBM derivada de una capa media del hueso y, a su vez, la DBM derivada de una capa media del hueso tiene una actividad biológica acrecentada cuando se compara con DBM extraída de la capa endóstica del hueso. Por consiguiente, las composiciones de DBM dadas en la presente memoria comprenden una cantidad desproporcionada de hueso derivada de la capa externa de un hueso cortical. Las composiciones de DBM dada en la presente memoria puede incluir otros componentes tales como soportes, factores de crecimiento, excipientes, o similares, y puede conformarse en un implante y/o puede proporcionarse en dispositivo contenedor.

Las actividades biológicas de la composición de DBM proporcionada en la presente memoria que pueden aumentarse incluyen, pero no se limitan a, actividad osteoinductora, actividad osteogénica, actividad condrogénica, actividad de curado de heridas, actividad neurogénica, actividad inductora de las contracciones, actividad inductora de la mitosis, actividad inductora de la diferenciación, actividad quimiotáctica, actividad angiogénica o vasculogénica, y actividad inductora de la exocitosis o de la endocitosis. Se apreciará que los procesos de formación de los huesos incluyen frecuentemente una primera etapa de formación del cartílago que crea la forma básica del hueso, el cual entonces se mineraliza (formación de hueso endocondral). Por tanto, en muchos casos, la condrogénesis puede considerarse una etapa temprana de la osteogénesis, aunque desde luego también puede ocurrir en otros contextos.

III. Proporción de partículas óseas

El hueso se proporciona para la molienda en forma de partículas. El hueso puede ser autógeno, alogénico, xenogénico o transgénico. En general, las composiciones dadas en la presente memoria se derivan del hueso cortical. Más específicamente, las composiciones dadas en la presente memoria se derivan típicamente del eje de huesos largos. Sin embargo, en algunas realizaciones las composiciones pueden derivarse de otras estructuras de huesos corticales tales como los huesos planos del cráneo o de las superficies del ilio.

Según la enseñanzas de la presente memoria, se ha descubierto que la DBM formada a partir de hueso extraído de la capa perióstica tiene mayor actividad osteoinductora que la DBM formada a partir de hueso extraído de la capa media o de la endóstica. La FIG 1a ilustra capas óseas 12, 14, 16 de un hueso largo cortical 10. Se advierte que la FIG 1a no es un dibujo a escala. Una capa externa perióstica 12, denominada la capa perióstica, está presente bajo la membrana fibrosa densa (periostio) que cubre la superficie externa del hueso. La capa media 14 de hueso cortical está en el interior de la capa perióstica y una capa interna/endóstica 16, denominada la capa endóstica, está en el interior del hueso largo 10 que rodea la cavidad 18 de la médula. La profundidad de la capa externa/perióstica 12, la capa 14 y la capa interna/endóstica 16 puede determinarse como un porcentaje de la profundidad del hueso o puede determinarse como un valor específico.

En una realización, la capa externa/perióstica se extiende desde la superficie externa del hueso hasta aproximadamente 1,5 mm de profundidad, la capa media se extiende desde aproximadamente 1,5 mm de profundidad a aproximadamente 3 mm de profundidad, y la capa interna/endóstica se extiende desde aproximadamente 3 mm de profundidad hasta aproximadamente 4,5 mm de profundidad. Estos valores son sólo para fines ilustrativos y los valores variarán en base a, al menos, el tamaño del hueso. En otra realización, la capa externa/perióstica comprende aproximadamente un tercio de la profundidad del hueso, la capa media comprende aproximadamente un tercio de la profundidad del hueso y la capa interna/endóstica comprende aproximadamente un tercio de la profundidad del hueso. Aunque en algunas realizaciones se considera que el hueso tiene tres capas, se ha de apreciar que el hueso puede considerarse que tiene más o menos que tres capas. Por ejemplo, en la realización de la FIG. 1b, una capa, la capa externa-media, puede considerarse entre la capa externa/perióstica y la capa media y otra capa, la capa interna-media, puede considerarse entre la capa media y la capa interna/endóstica. Cuando se consideran cinco capas, cada capa puede comprender aproximadamente 20% de la profundidad del hueso o aproximadamente 1-1,5 mm. Además, en alguna realización, puede considerarse que el hueso tiene sólo dos capas, una capa interna/endóstica y una externa/perióstica, donde cada capa comprende aproximadamente 50% de la profundidad del hueso o aproximadamente 2-4,5 mm.

En general, se ha de apreciar que el hueso, y la osteoinductividad del hueso, pasa desde la capa interna/endóstica a la capa externa/perióstica. Por tanto, los porcentajes exactos del hueso atribuidos a la capa interna/endóstica, la capa media y la capa externa/perióstica pueden variar y se pretende que porcentajes de 30% ó 20% sean sólo ilustrativos de algunos valores de las capas. Además, aunque según una realización específica, la capa perióstica comprende aproximadamente los 1,5 mm exteriores del hueso, la capa media comprende aproximadamente los 1,5 mm medios del hueso, y la capa endóstica comprende aproximadamente los 1,5 mm de la capa interna del hueso, se ha de apreciar que estos valores son de un ejemplo particular y aplican a un hueso de dimensiones específicas y estos valores variarán dependiendo de la edad del hueso, la localización del hueso (por ej., si es fémur, húmero u otro) y el espesor del hueso.

En varias realizaciones, se proporcionan una composición o producto que comprenden un porcentaje desproporcionado de hueso de la capa perióstica. Cuando se considera un hueso completo que comprende aproximadamente un tercio de capa endóstica, aproximadamente un tercio de capa media, y aproximadamente un tercio de capa perióstica, si se moliera el hueso completo sería de esperar que aproximadamente un tercio del hueso molido fuera de la capa perióstica. Por tanto, según algunas realizaciones, puede proporcionarse una composición o producto que comprende por encima de aproximadamente un tercio de hueso de la capa perióstica. Similarmente, en algunas realizaciones, puede proporcionarse una composición o producto que comprende por encima de aproximadamente dos tercios de hueso de las capas perióstica y media. Además, cuando se considera que el hueso completo comprende cinco capas estando aproximadamente 20% de la profundidad del hueso en la capa perióstica, si el hueso completo se moliera sería de esperar que aproximadamente 20% del hueso molido fuera de la capa perióstica.

Por tanto, según algunas realizaciones, pueden proporcionarse una composición o producto que comprenda un exceso de aproximadamente 20% de hueso de la capa perióstica. Similarmente, en algunas realizaciones, pueden proporcionarse una composición o producto que comprenda por encima de aproximadamente 60% de hueso de las capas perióstica y media.

La manera de moler o separar las capas del hueso cortical puede variarse. Por ejemplo, el hueso puede tornearse para separar capas secuenciales. Alternativamente, la capa perióstica puede separarse cortando a lo largo de las líneas de corte 20, como se muestra en la FIG. 1c. Las líneas de corte 20 producen así segmentos 22 de hueso principalmente derivados de la capa perióstica. La capa media y la capa endóstica pueden procesarse separadamente conjuntamente como un monolito 24 ó material molido, en forma de partículas, o de otro tipo. Por

tanto, según varias realizaciones, cada una de las capas perióstica, media y endóstica puede procesarse y usarse en una osteocomposición, separadamente o en alguna combinación.

El hueso puede molturarse o molerse o procesarse de otro modo en forma de partículas de un tamaño apropiado antes o después de la desmineralización. Se ha de entender que hueso "molido", como se usa en la presente memoria, puede referirse a cualquier forma de hueso en forma de partículas, que incluyen fibras, partículas, astillas, etc. Cada capa puede procesarse separadamente o algunas capas pueden combinarse, tales como la capa media y la capa perióstica. Las partículas pueden estar en forma de partículas o en forma fibrosa. En algunas realizaciones, las partículas de la capa endóstica pueden tener una configuración diferente de partículas de la capa perióstica o de la capa media. Así, en algunas realizaciones, las partículas endósticas pueden ser partículas pequeñas mientras que las partículas periósticas pueden ser fibrosas y grandes. Cada una de las partículas endósticas, las partículas de la capa media y las partículas de la capa perióstica pueden ser particuladas o fibrosas, grandes o pequeñas. La configuración de partículas de cualquier capa dada puede determinarse en base a las características deseadas de la DBM y/o el implante. Así, por ejemplo, el hueso perióstico, que en general es más osteoinductor que el hueso endóstico, como se describe en la presente memoria, puede configurarse para reforzar tal osteoinductividad, tal como por molienda, en fibras. En ciertas realizaciones, el tamaño de partícula es mayor que 75 micrómetros, tal como variando de aproximadamente 100 a aproximadamente 3000 micrómetros, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 2000 micrómetros. Después de moler, las partículas óseas pueden tamizarse para seleccionar aquellas partículas de un tamaño deseado. En ciertas realizaciones, las partículas pueden tamizarse a través de un tamiz de 50 micrómetros, un tamiz de 75 micrómetros, o un tamiz de 100 micrómetros.

Los métodos dados en la presente memoria pueden además comprender separar el hueso endóstico, procesarlo separadamente, y usarlo para otras aplicaciones. En algunas aplicaciones, la osteoinductividad del hueso puede ser menor que un factor y, por consiguiente, puede ser beneficioso usar hueso que es menos osteoinductor, tal como hueso endóstico. Así, puede retenerse el hueso que es más osteoinductor, tal como el hueso perióstico, para aplicaciones en las que es deseable la osteoinductividad. La separación del hueso de la capa perióstica, hueso de la capa media y/o hueso de la capa endóstica facilita la consecución de diferentes potenciales osteoinductores que pueden personalizarse a la aplicación del hueso.

En la formación de partículas óseas se hace descripción de la molienda de hueso de una capa perióstica, molienda de hueso de una capa media y molienda de hueso de una capa endóstica, y de la separación del hueso de las diversas capas. Se ha de entender que tal separación incluye separar mientras se muele, por ejemplo, moliendo la capa externa, moviendo el material molido, moliendo la capa media, moviendo el material molido, y moliendo la capa interna. Alternativamente, tal separación puede hacerse dividiendo el hueso en la capa externa, la capa media y la capa interna, y moliendo separadamente cada capa. Alternativamente, el hueso puede molerse y separarse después de la molienda, por ejemplo, moliendo cada capa hasta un tamaño de partícula diferente y desplazando el material molido.

IV. Desmineralización de las partículas óseas

La DBM puede prepararse de cualquier manera adecuada. En una realización, la DBM se prepara por medio de la extracción ácida de los minerales del hueso. Incluye la matriz de colágeno del hueso junto con proteínas insolubles en medio ácido que incluyen proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) y otros factores de crecimiento. Puede formularse para usar como gránulos, geles, material esponjoso o masilla y puede liofilizarse para su almacenamiento. Los procedimientos de esterilización usados para proteger de la transmisión de enfermedades pueden reducir la actividad de los factores de crecimiento beneficiosos en la DBM. La DBM proporciona una matriz osteoconductor inicial y exhibe un grado de potencial osteoinductor, induciendo la infiltración y diferenciación de células osteoprogenitoras de los tejidos circundantes. Como se ha señalado, en realizaciones de partículas óseas extraídas de huesos largos corticales, el potencial osteoinductor de las partículas óseas cuando se desmineralizan puede variar dependiendo de la fuente de las partículas óseas, bien de la capa perióstica, la capa media, bien de la capa endóstica.

Durante muchos años se han usado preparaciones de DBM en medicina ortopédica para promover la formación del hueso. Por ejemplo, la DBM ha encontrado uso en la reparación de fracturas, en la fusión de vértebras, en cirugía de reemplazamiento de articulaciones, y en el tratamiento de la destrucción ósea debida a enfermedades subyacentes tales como al artritis reumatoide. Se piensa que la DBM promueve la formación de huesos in vivo mediante procesos osteoconductores y osteoinductores. Se piensa que el efecto osteoinductor de composiciones de DBM implantadas procede de la presencia de factores de crecimiento activos presentes en la matriz aislada basada en colágeno. Estos factores incluyen miembros de las familias de proteínas TGF- β , IGF y BMP. Ejemplos particulares de factores osteoinductores incluyen TGF- β , IGF-1, IGF-2, BMP-2, BMP-7, hormona paratiroide (PTH) y factores angiogénicos. En las preparaciones de DBM probablemente también están presentes otros factores osteoinductores tales como la osteocalcina y la osteopontina. Probablemente también están presentes en la DBM otros factores osteoinductores no nombrados o no descubiertos.

En un procedimiento de desmineralización, el hueso se somete a una etapa de desmineralización con ácidos

seguida por una etapa de desengrasado/desinfección. El hueso se sumerge en ácido para efectuar la desmineralización. Los ácidos que pueden emplearse en esta etapa incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico así como ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido peracético, ácido cítrico, ácido propiónico, etc. La profundidad de la desmineralización en la superficie del hueso puede controlarse ajustando el tiempo de tratamiento, la temperatura de la disolución de desmineralización, la concentración de la disolución de desmineralización y la intensidad de la agitación durante el tratamiento. Así, en varias realizaciones, la DBM puede estar completamente desmineralizada, parcialmente desmineralizada o superficialmente desmineralizada.

El hueso desmineralizado se enjuaga con agua estéril y/o disolución o disoluciones tamponadas para separar cantidades residuales de ácido y de este modo aumentar el pH. Una disolución desengrasante/desinfectante adecuada es una disolución acuosa de etanol, siendo el etanol un buen disolvente de lípidos y el agua un buen soporte hidrófilo para permitir que la disolución penetre más profundamente en las partículas óseas. La disolución acuosa de etanol también desinfecta el hueso matando microorganismos y virus vegetativos. Ordinariamente, al menos está presente en la disolución desengrasante y desinfectante aproximadamente 10 a 40 por ciento en peso de agua (es decir, aproximadamente 60 a 90 por ciento en peso de agente desengrasante tal como alcohol) para producir la separación óptima de los lípidos y la desinfección óptima dentro de un período de tiempo dado. Un intervalo de concentración adecuado de la disolución desengrasante es de aproximadamente 60 a aproximadamente 85 por ciento en peso de alcohol, o aproximadamente 70 por ciento en peso de alcohol.

En algunas realizaciones, el hueso desmineralizado puede tratarse adicionalmente para conformar las propiedades del hueso. Por ejemplo, la DBM puede tratarse para desbaratar la estructura del colágeno de la DBM. Tal tratamiento puede comprender tratamiento con colagenasa, tratamiento térmico, tratamiento mecánico, u otro, las Solicitudes de Patente Provisional de EE.UU. 60/944.408, 60/944.417 y 60/957.614 describen más opciones de tratamiento.

V. Aditivos opcionales

Según varias realizaciones, la DBM proporcionada en la presente memoria puede usarse con factores de crecimiento, extractos, hormonas peptídicas u otros aditivos para aumentar la capacidad osteoconductora de la DBM o para impartir otros beneficios a la DBM. Se apreciará que la cantidad de aditivo usada variará dependiendo del tipo de aditivo, la actividad específica de la preparación de aditivo particular empleada, y del uso pretendido de la composición. La cantidad deseada es fácilmente determinable por el usuario.

Cualquiera de una variedad de sustancias opcionales médica y/o quirúrgicamente útiles puede ser incorporada en, o asociada con, los factores osteoinductores antes, durante o después de la preparación de la composición osteoinductora. Así, por ejemplo, cuando se usan partículas óseas desmineralizadas para formar el material, puede introducirse una o más de tales sustancias en las partículas óseas desmineralizadas, por ejemplo, por mojado o inmersión de las partículas óseas en una disolución o dispersión de la sustancia o sustancias deseadas.

Las sustancias médica/quirúrgicamente útiles que pueden combinarse fácilmente con la DBM incluyen, por ejemplo, colágeno, derivados insolubles de colágeno, etc., y sólidos y/o líquidos solubles disueltos en los mismos, por ej., antivirídicas, particularmente los efectivos contra HIV y la hepatitis; antimicrobianos y/o antibióticos tales como eritromicina, bacitrina, neomicina, penicilina, polimixina B, tetraciclina, viomicina, cloromicetina y estreptomycinas, cefazolina, ampicilina, azactam, tobramicina, clindamicina y gentamicina, etc.; azúcares biocidas/biostáticos tales como dextrosa, glucosa, etc.; aminoácidos, péptidos, vitaminas, elementos inorgánicos, cofactores para la síntesis de proteínas; hormonas; tejido o fragmentos de tejido endocrino; sensibilizadores; enzimas tales como colagenasa, peptidasas, oxidasas, etc.; andamios celulares poliméricos con células parenquimales, fármacos angiogénicos y soportes poliméricos que contienen tales fármacos, entramados de colágeno; agentes antigénicos; agentes esqueléticos; fragmentos de cartílago, células vivas tales como condrocitos, células de médula ósea, células madre mesenquimales, extractos naturales, trasplantes de tejido, hueso, hueso en polvo desmineralizado, tejidos autógenos tales como sangre, suero, tejido blando, médula ósea, etc.; bioadhesivos, proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), factores angiogénicos, factor del crecimiento transformante (TGF-beta), factor del crecimiento semejante a la insulina (IGF-1); hormonas del crecimiento tales como somatotropina; digestores óseos; agentes antitumorales; inmunosupresores; potenciadores de la permeación, por ej., ésteres de ácidos grasos tales como monoésteres de polietilenglicol de laurato, miristato y estearato, derivados de enamina, alfa-ceto aldehídos, etc.; y ácidos nucleicos. Las cantidades de tales sustancias opcionalmente añadidas pueden variar ampliamente determinándose fácilmente las concentraciones óptimas en un caso específico por experimentación rutinaria.

En una realización, puede añadirse un extracto derivado de tejidos a la DBM. Las Solicitudes de Patente de EE.UU. n°s de Serie 11/555.606 y 11/555.608 describen tales extractos y la adición de tales extractos a DBM. Por ejemplo, puede añadirse un extracto derivado de tejido o hueso parcialmente desmineralizado a la matriz ósea desmineralizada. El extracto puede derivarse de cualquier tejido adecuado, tal como hueso, vejiga, riñón, cerebro, piel o tejido conjuntivo. Además, el extracto puede derivarse de cualquier manera adecuada. El extracto puede ser alogénico, autogénico, xenogénico o transgénico. En realizaciones en las que el extracto se deriva de hueso, el hueso puede ser cortical, esponjoso o corticoesponjoso y puede estar desmineralizado, parcialmente

desmineralizado o mineralizado. En algunas realizaciones, el extracto derivado de tejidos puede ser un extracto de proteínas.

La regeneración ósea implica a una multitud de células (por ej., del cartílago, fibroblastos, endoteliales, etc.) además de osteoblastos. Pueden combinarse células madres con la DBM. Por consiguiente, la composición osteoinductora de DBM puede usarse para suministrar células madre, lo cual ofrece el potencial de dar lugar a diferentes tipos de células en el proceso de reparación del hueso. En una realización, la composición osteoinductora de DBM además comprende una célula tal como una célula osteogénica o una célula madre. En varias realizaciones, el aditivo puede comprender sustancias radiopacas, materiales promotores de la angiogénesis, agentes bioactivos, agentes osteoinductores u otros. Las Solicitudes de Patente de EE.UU. n.ºs de Serie 11/555.606 y 11/555.608 describen posibles aditivos.

En ciertas realizaciones, el aditivo es adsorbido por o está de otra forma asociado con la DBM. El aditivo puede estar asociado con la composición osteoinductora de DBM a través de interacciones específicas o no específicas, o interacciones covalentes o no covalentes. Ejemplos de interacciones específicas incluyen aquellas entre un ligando y un receptor, un epítipo y un anticuerpo, etc. Ejemplos de interacciones no específicas incluyen interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas, interacciones magnéticas, interacciones dipolares, interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, etc. En ciertas realizaciones, el aditivo está unido a la composición osteoinductora de DBM, por ejemplo al soporte, usando un agente de unión para que aditivo esté libre para asociarse con su receptor o sitio de acción *in vivo*. En otras realizaciones, el aditivo está unido al soporte covalente o no covalentemente. En ciertas realizaciones, el aditivo puede estar unido a un compuesto químico tal como un péptido que es reconocido por el soporte. En otra realización, el aditivo está unido a un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que reconoce un epítipo encontrado dentro del soporte. En ciertas realizaciones, los aditivos están al menos unidos al osteoimplante. En ciertas realizaciones, al menos tres aditivos están unidos a la composición osteoinductora. Puede proporcionarse un aditivo dentro de la composición osteoinductora en un formato de liberación sostenida. Por ejemplo, el aditivo puede estar encapsulado dentro de nanoesferas, microesferas, etc., biodegradables.

Puede usarse cualquier método para añadir o dispersar el aditivo en la DBM. En general, los procedimientos usados para formular o dispersar el aditivo sobre la DBM son sensibles al estado físico y químico tanto del aditivo como de la DBM.

VI. Adición de DBM al soporte

En varias realizaciones, la DBM proporcionada en la presente memoria puede combinarse, con o sin aditivos, con un soporte o excipiente para conseguir consistencia para usos específicos. Por ejemplo, puede seleccionarse un soporte para proporcionar la composición de DBM con una consistencia de gel, una consistencia de masilla, una consistencia de matriz u otra, para formar una composición osteoinductora. La composición osteoinductora puede configurarse para que sea moldeable, extruible o sustancialmente sólida. La composición osteoinductora puede configurarse para que sustancialmente retenga su forma en agua durante un período de tiempo. La composición osteoinductora puede formar un osteoimplante útil en aplicaciones clínicas. Los soportes adecuados pueden incluir hueso superficialmente desmineralizado; hueso mineralizado; andamios esponjosos no desmineralizados; andamios esponjosos desmineralizados; astillas esponjosas; hueso específico de la especie (allogénico) en forma de partículas, desmineralizado y extraído en guanidina; hueso xenogénico especialmente tratado en forma de partículas, desmineralizado y extraído en proteínas; colágeno; hidroxiapatitas sintéticas; materiales sintéticos de fosfato de calcio; fosfato tricálcico, hidroxiapatita sinterizada, hidroxiapatita endurecible; polímeros de polilactida; polímeros de poliglicolida, copolímeros de polilactida-co-glicolida; tirosina policarbonato; sulfato de calcio; láminas de colágeno; fosfato de calcio endurecible; cementos poliméricos; poli(alcoholes vinílicos) endurecibles, poliuretanos; polímeros reabsorbibles; y otros grandes moléculas; polímeros líquidos endurecibles; y otros materiales endurecibles biocompatibles. El soporte puede además comprender un poliol (incluyendo glicerol u otro compuesto polihidroxílico), un polisacárido (incluyendo almidones), un hidrogel (incluyendo alginato, quitosano, dextrano, pluronic, N,O-carboximetilquitosano glucosamina (NOCC)), celulosa hidrolizada, o un polímero (incluyendo polietilenglicol). En realizaciones en las que se usa quitosano como un soporte, el quitosano puede disolverse usando métodos conocidos que incluyen en agua, en disoluciones acuosas suavemente ácidas, en disoluciones ácidas, etc.

En las Publicaciones de Patente de EE.UU. Nos. 2007/0191963, 2006/0216323, y 2005/0251267, Patentes de EE.UU. Nos. 6.696.073, 6.478.825, 6.440.444, y 6.294.187, se describen materiales poliméricos adecuados para usar como soportes.

El soporte puede además comprender un hidrogel tal como ácido hialurónico, dextrano, copolímeros de bloques tipo Pluronic de poli(óxido de etileno) y polipropileno, y otros. Compuestos polihidroxílicos adecuados incluyen compuestos de tales clases como alcoholes polihídricos acíclicos, azúcares no reductores, azúcares alcoholes, azúcares ácidos, polisacáridos y derivados conocidos de los precedentes. Un soporte ejemplo comprende monolaurato de glicerilo disuelto en glicerol o una mezcla 4:1 a 1:4 en peso de glicerol y propilenglicol. Las Patentes de EE.UU. Nos. 5.284.655 y 5.314.476 describen soportes que incluyen soportes polihidroxihídricos, la Patente de

EE.UU. No. 6.884.778 describe macrómeros biocompatibles que pueden usarse como soportes, y la Publicación de Patente de EE.UU. No. 2003/0152548 describe monómeros reticulables que pueden usarse como soportes, todas incorporadas por referencia a la presente memoria. Pueden usarse materiales endurecibles y pueden colocarse *in situ* o antes de la implantación. Opcionalmente, también pueden tratarse soportes tipo hueso xenogénico en polvo con proteasas tales como tripsina. Los soportes xenogénicos pueden tratarse con uno o más agentes modificadores de fibrillas para aumentar el volumen de intrusión intrapartículas (porosidad) y el área superficial. Los agentes útiles incluyen disolventes tales como diclorometano, ácido tricloroacético, acetonitrilo y ácidos tales como ácido trifluoroacético y fluoruro de hidrógeno. La selección del material puede depender de las características deseadas de la composición. En algunas realizaciones, puede añadirse un lubricante, tal como agua, glicerol o polietilenglicol.

Pueden usarse cualquier forma, tamaño y porosidad adecuadas del soporte. En algunas realizaciones, el soporte puede ser endurecible y/o inyectable. Tal soporte puede ser, por ejemplo, un cemento polimérico, un fosfato de calcio endurecible, un poli(alcohol vinílico) endurecible, un poliuretano, o un polímero líquido endurecible. En las Patentes de EE.UU. Nos. 5.336.264 se describen fosfatos de calcio endurecibles adecuados. Los soportes tipo hidrogel pueden adicionalmente impartir mejores propiedades espaciales, tales como propiedades de manipulación y envasado, a la composición osteoinductora. Puede ser deseable un soporte inyectable cuando la composición se usa con un dispositivo contenedor. Además, los materiales seleccionados tienen que ser biocompatibles *in vivo* y opcionalmente biodegradables. En algunos usos, el soporte actúa como un andamio temporal hasta que es reemplazado por hueso nuevo. El poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y varias combinaciones tienen diferentes velocidades de disolución *in vivo*. En el hueso, las velocidades de disolución pueden variar según si la composición se coloca en hueso cortical o trabecular.

El soporte puede comprender un sólido que retiene la forma hecho de material en partículas flojamente adherido, por ej., con colágeno. Alternativamente, puede comprender un sólido moldeado, poroso, un sólido monolítico, o un agregado de partículas estrechamente empaquetadas mantenidas en su lugar por el tejido circundante. También puede usarse músculo masticatorio u otro tejido. Los implantes de huesos largos alogénicos pueden actuar como soportes, por ejemplo cuando sus cavidades medulares se limpian y empaquetan con DBM y, opcionalmente, los factores osteoinductores.

Una forma de proteger partículas de pequeño tamaño de la ingestión celular y/o de proporcionar una barrera de difusión es embeberlas en una matriz monolítica bioabsorbible y a continuación fragmentar la matriz monolítica que contiene partículas en tamaños de partícula mayores que 70 micrómetros, por ejemplo mayores que 100 micrómetros, o mayores que 150 micrómetros en su dimensión más pequeña. Las matrices adecuadas para embeber composiciones de DBM incluyen polímeros biocompatibles y cementos endurecibles de fosfato de calcio. En general, la relación en peso composición de DBM/polímero variará de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:3. En el caso de fosfato de calcio, la DBM puede estar presente en hasta 75% en peso. En una realización, la DBM está embebida en un polímero reabsorbible. En otra realización, las partículas de hueso parcialmente desmineralizado están embebidas en uno de los fosfatos de calcio endurecibles conocidos en la técnica.

El soporte puede comprender varios materiales en combinación, algunos o todos de los cuales pueden estar en forma de fibras y/o partículas. El soporte puede comprender fosfatos de calcio, véase Driessens et al. "Calcium phosphate bone cements," Wise, D.L., Ed., *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part B, Applications*, Nueva York: Marcel Decker; Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Phosphates* Elsevier, Amsterdam, 1994. Las matrices de fosfato de calcio incluyen, pero no se limitan a, fosfato de dicalcio dihidrato, monetita, fosfato tricálcico, fosfato tetracálcico, hidroxiapatita, hidroxiapatita nanocristalina, hidroxiapatita pobremente cristalina, hidroxiapatita sustituida e hidroxiapatitas deficientes en calcio.

En una realización, el soporte comprende un material osteoinductor tal como un material en partículas mineralizado, factores de crecimiento osteoinductores o hueso parcialmente desmineralizado. El material en partículas mineralizado puede ser TCP, hidroxiapatita, mineral recuperado del hueso, astillas esponjosas, astillas corticales, hueso superficialmente desmineralizado, u otro material. El material osteoinductor puede combinarse con otro soporte tal como almidón o glicerol. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el hueso parcialmente desmineralizado puede actuar como soporte del extracto derivado de tejido.

La composición de DBM puede ser completamente insoluble o puede ser lentamente solubilizada después de su implante. Tras el implante, la composición puede reabsorberse o degradarse, permaneciendo sustancialmente intacta durante al menos siete días, o durante dos o cuatro semanas o más tiempo y con frecuencia más de 60 días. La composición puede así ser reabsorbida antes de una semana, dos semanas, tres semanas, u otras, permitiendo la entrada de células que sanen el hueso.

VII. Formación de un implante

La DBM proporcionada en la presente memoria puede usarse para formar un implante osteoinductor. El osteoimplante resultante de la DBM, aditivo y/o soporte puede ser capaz de fluir, tener una consistencia de masilla, puede conformarse o moldearse y/o puede ser deformable. El osteoimplante puede asumir una forma o

configuración determinada o regular tal como una lámina, placa, disco, túnel, cono o tubo, por nombrar unos pocos. La geometría prefabricada puede incluir, pero no está limitada a, un delantal de media luna para usar en un único sitio, una forma de I para ser colocada entre los dientes para defectos intraóseos, un babero rectangular para defectos que implican crestas alveolares tanto bucales como alveolares, placas de neutralización, placas reconstructivas, placas sostén, placas sostén en forma de T, placas cuchara, placas en forma de hojas de trébol, placas condilares, placas de compresión, placas puentes o placas onduladas. A partir del osteoimplante pueden fabricarse placas tubulares parciales así como placas planas. Tales placas pueden incluir conformaciones tales como, por ej., conformadas con contorno cóncavo, en forma de cuenco o con defectos. El osteoimplante puede maquinarse o conformarse mediante cualquier medio adecuado de conformación mecánica. Puede proporcionarse un conformado computarizado para la arquitectura tridimensional intrincadamente conformada de un osteoimplante con formado a medida al sitio del hueso a reparar con gran precisión. En realizaciones en las que el osteoimplante es conformable o moldeable, el implante puede retener coherencia en fluidos.

Por consiguiente, la composición osteoinductora de DBM puede someterse a una etapa configuradora para formar un osteoimplante. La etapa configuradora puede emplearse usando equipamiento convencional conocido por los expertos en la técnica para producir una amplia variedad de geometrías, por ej., superficies cóncavas o convexas, superficies escalonadas, clavijas cilíndricas, cuñas, bloques, tornillos, y similares. En las Patentes de EE.UU. Nos. 5.507.813 y 6.436.138 se describen, respectivamente, un material quirúrgicamente implantable fabricado a partir de partículas óseas alargadas que han sido desmineralizadas según la invención, el cual puede conformarse como una lámina, y procedimientos para fabricar materiales conformados a partir de partículas óseas desmineralizadas. Las láminas adecuadas incluyen las vendidas con el nombre comercial Grafton® DBM Flex, las cuales tienen que humectarse/hidratarse antes de su uso para ser útiles para implantar. Recientemente, se ha informado que tales láminas son efectivas para sembrar células estromales de médula ósea (BMSCs) de ser humano, las cuales pueden ser útiles en la reparación de defectos en huesos largos, véase Kasten et al., "Comparison of Human Bone Marrow Stromal Cells Seeded on Calcium-Deficient Hydroxyapatite, Betatricalcium Phosphate and Demineralized Bone Matrix," *Biomaterials*, 24(15): 2593-603, 2003. También son útiles el hueso desmineralizado y otros preparados matriz que comprenden aditivos o soportes tales como ligantes, cargas, plastificantes, agentes humectantes, agentes tensioactivos, agentes biostáticos, agentes biocidas, y similares. Algunos aditivos y soportes ejemplo incluyen compuestos polihidroxílicos, polisacáridos, glicosaminoglican-proteínas, ácidos nucleicos, polímeros, polaxómeros, resinas, arcillas, sales de calcio y/o derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición osteoinductora de DBM puede colocarse en un dispositivo contenedor, tal como una malla porosa, para proporcionar un sistema de administración. En varias realizaciones, el dispositivo puede comprender un polímero (tal como polialquilenos (por ej., polietilenos, polipropilenos, etc.), poliamidas, poliésteres, poliuretanos, poli(ácido láctico-ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(glaxanona), poli(ortoésteres), poli(ácido pirólico), poli(fosfazenos), L-co-G, etc.), otro polímero bioabsorbible tal como Dacron u otros plásticos quirúrgicos conocidos, un material natural biológicamente derivado tal como colágeno, un material cerámico con potenciadores del crecimiento óseo, hidroxiapatita, etc.), PEEK (poliéter-étercetona), material desecado biodegradable, un metal, materiales compuestos, un material textil biocompatible (por ej., algodón, seda, lino), u otros. En una realización, el dispositivo contenedor está conformado como un dispositivo largo semejante a una bolsa y puede usarse con técnicas mínimamente invasivas.

VIII. Formulación de composiciones que contiene DBM

La composición osteoconductora de DBM, el soporte, o el osteoimplante puede formularse para un uso particular. La formulación puede usarse para alterar las propiedades físicas, biológicas o químicas del soporte. Un médico será fácilmente capaz de determinar la formulación necesaria para una aplicación particular, teniendo en cuenta factores tales como el tipo de lesión, el sitio de la lesión, la salud del paciente y el riesgo de infección. En varias realizaciones, la composición osteoconductora puede comprender, por ejemplo, menos que aproximadamente 0,5% de agua, menos que aproximadamente 1% de agua, o menos que aproximadamente 5% de agua.

Por lo tanto, pueden prepararse composiciones osteoinductoras de DBM, soportes, u osteoimplantes para que tengan una reabsorción/pérdida seleccionada de velocidades de osteoinductividad, o incluso para que tengan diferentes velocidades en diferentes porciones de un implante. Por ejemplo, el procedimiento de formulación puede incluir la selección de partículas parcialmente desmineralizadas de un tamaño o composición particular, combinada con la selección de un agente o agentes estabilizantes particulares, y de las cantidades de tales agentes.

Las propiedades físicas tales como la deformabilidad y la viscosidad del soporte también pueden escogerse dependiendo de la aplicación clínica particular. La DBM proporcionada en la presente memoria puede mezclarse con hueso parcialmente desmineralizado y/u otros materiales y factores para mejorar otras características del implante. Por ejemplo, la DBM puede mezclarse con otros agentes para mejorar la curación de las heridas. Estos agentes pueden incluir fármacos, proteínas, péptidos, polinucleótidos, disolventes, compuestos químicos y moléculas biológicas.

Además, la composición de DBM puede formularse para que sea endurecible y/o inyectable. Así, por ejemplo, la

composición puede ser inyectable a través de un jeringa de calibre 10, 12 ó 18.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la composición de DBM puede ser caudoide con trozos, rígida (como liofilizada), rígida con trozos, con consistencia de masilla, pastosa, fluida o inyectable. La expresión "con capacidad de fluir" en este contexto se aplica a composiciones cuyas consistencias varían desde las que pueden describirse como que mantienen la forma pero son fácilmente deformables, por ej., las que se comportan como la masilla, a las que son líquidas. Formas específicas de composiciones de hueso en polvo con capacidad de fluir incluyen tortas, pastas, cremas y cargas. La Patente de EE.UU. n° 5.290.558 describe materiales con capacidad de fluir.

Asimismo, como se trató previamente, la composición osteoinductora de DBM también puede conformarse en varias formas y configuraciones, que incluyen barras, cordeles, láminas, tejidos, sólidos, conos, discos, fibras y cuñas. Tales formas pueden proceder de una pieza de hueso monolítico o de un agregado de partículas óseas. En ciertas realizaciones, la forma y el tamaño de la DBM influyen en el transcurso de tiempo de la osteoinductividad. Por ejemplo, en una forma de cono o de cuña, el extremo en punta dará lugar a osteoinductividad poco después de la implantación del osteoimplante, mientras que el extremo más grueso conducirá a osteoinductividad más tarde en el proceso de curado (de horas a días y semanas más tarde). En ciertas realizaciones, los osteoimplantes de DBM pueden incluir un agregado de partículas óseas, y las partículas tienen una longitud mayor que 2 mm, mayor que 1,5 mm, mayor que 1 mm, mayor que 500 micrómetros o mayor que 200 micrómetros a través de su dimensión más ancha. Asimismo, el tamaño más grande de partícula inducirá formación de hueso en un transcurso de tiempo más largo que las partículas más pequeñas. En la formación de estas diferentes formas y configuraciones pueden usarse partículas de diferentes características (por ej., composición, tamaño, forma). Por ejemplo, el implante de DBM puede incluir una lámina de hueso parcialmente desmineralizado, con una capa de partículas de larga vida media alternada entre capas de partículas de vida media más corta. Véase la Patente de EE.UU. No. 5.899.939 para ejemplos adecuados. En un tejido, pueden tejerse conjuntamente hebras compuestas de partículas de corta vida media con hebras de vida media más larga.

En el procedimiento de preparación del osteoimplante de DBM, los materiales pueden producirse enteramente asépticamente o ser esterilizados para eliminar cualquier agente infeccioso tal como HIV, hepatitis B o hepatitis C. La esterilización puede conseguirse usando antibióticos, irradiación, esterilización química (por ej., con óxido de etileno), o esterilización térmica. En la preparación del soporte de DBM también pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica de preparación de DBM, tales como el desengrasado, la sonicación y la liofilización. Puesto que se sabe que la actividad biológica del hueso desmineralizado es perjudicialmente afectada por la mayor parte de los procedimientos terminales de esterilización, cuando se esterilizan las composiciones inventivas se tiene que tener cuidado.

IX. Ejemplos

Ejemplo 1

Se molió radialmente una sección de fémur de ser humano para aislar las capas radiales de la diáfisis del hueso. Después de separar el hueso esponjoso de la cavidad de la médula, el hueso cortical se molió a tres profundidades para obtener muestras de las tres capas mostradas en la FIG. 1b. Brevemente, se molieron fibras de la capa perióstica (capa experimental 1) a una profundidad de aproximadamente 1,5 mm de espesor y se guardaron. A continuación, se molió una capa de fibras de debajo y se desechó. A continuación, se molieron fibras del medio del hueso cortical (capa experimental 2) a una profundidad de aproximadamente 1,5 mm de espesor y se guardaron. Luego, se molió una capa de fibras internas y se desechó. Posteriormente, se molieron fibras de la capa endóstica (capa experimental 3) a una profundidad de aproximadamente 1,5 mm. Para no cosechar ninguna cantidad de hueso esponjoso residual, las regiones más internas no se molieron. Después de recoger las capas experimentales deseadas, las fibras mineralizadas se desmineralizaron. Las fibras de DBM se implantaron a continuación en ratas atímicas y los nódulos resultantes se explantaron después de 28 días. Los implantes comprendieron 6 implantes de capa externa/perióstica, 6 implantes de capa media y 6 implantes de capa interna/endóstica. Se analizó el crecimiento de nódulos de hueso alrededor de los implantes por rayos X, micro-CT y semicuantitativamente vía análisis histológico. Las proteínas diferentes del colágeno en las fibras de DBM se extrajeron y se analizaron cuantitativamente usando un Ensayo mediante Inmunoabsorbentes Ligado a Enzimas (ELISA).

La FIG. 2 ilustra los resultados de la osteoinducción radial específica para el análisis de rayos X. La FIG. 2 ilustra específicamente la osteoinducción en ratas atímicas. En la columna a mano izquierda se muestran nódulos que se originan en la capa perióstica o capa cortical externa (capa experimental 1). En la columna media se muestran nódulos que se originan en la capa media, y en la columna a mano derecha se muestran nódulos que se originan en la capa endóstica (capa experimental 3). Como se muestra, los nódulos de la capa cortical externa son más grandes, de forma más regular y tienen un aspecto más denso que los nódulos derivados de fibras en otras capas experimentales.

Las FIGS. 3 y 4 ilustran los resultados del análisis de Micro-CT de las capas experimentales. Específicamente, la FIG. 3 ilustra el volumen total de minerales en el hueso (mm^3) para nódulos inducidos por cada preparación en sitios

heterotópicos. Como se ilustra en el gráfico, la capa experimental 1 muestra un área mayor de formación de hueso que las capas experimentales 2 ó 3, mostrando la capa media (capa experimental 2) mayor osteoinducción que la capa interna/endóstica (capa experimental 3).

5 La FIG. 4 compara el porcentaje de hueso nuevo en el módulo de las tres capas corticales de hueso investigadas. Así, la FIG. 4 ilustra un histograma que compara el porcentaje de volumen total de minerales en el hueso con el volumen total de nódulos por cada preparación en sitios heterotópicos. Esta figura confirma los resultados de la FIG. 2, mostrando que la capa externa/perióstica (capa experimental 1) tiene un aumento mayor de formación de hueso comparada con las capas medias e interna/endóstica, mostrando la capa media un mayor porcentaje de aumento que la capa interna/endóstica.

10 Los resultados de la evaluación histológica del potencial osteoinductor de las tres preparaciones óseas se muestran en la FIG. 5. La FIG. 5 indica que la capa externa/perióstica mostró mayor formación de hueso que la capa media y que la capa media mostró mayor inducción que la interna/endóstica. Específicamente, la FIG. 5 ilustra una puntuación media para la osteoinductividad de 3,17 para la capa externa/perióstica, de 2,5 para la capa media y de 1,83 para la capa interna/endóstica. Por tanto, la FIG. 5 ilustra la significancia estadística de la diferencia en la actividad osteoinductora (OI) de DBM derivada de varias capas de hueso. Los resultados histológicos concuerdan con los resultados de micro-CT y rayos X en términos de capacidad osteoinductora *in vivo*.

15 La FIG. 6 es un gráfico que muestra la cantidad de BMP-2, un factor osteoinductor, en fibras de DBM obtenidas de tres preparaciones óseas, que incluyen una preparación de capa externa/perióstica, una preparación de capa media y una preparación de capa interna/endóstica. Como se muestra en el gráfico, la cantidad de BMP-2 es mayor en fibras de DBM fabricadas a partir de la capa externa/perióstica del hueso cortical que en fibras de DBM fabricadas a partir de la capa media. La cantidad de BMP-2 es mayor en fibras de DBM fabricadas a partir de la capa media que en fibras de DBM fabricadas a partir de la capa interna/endóstica. Los resultados de la cantidad de BMP-2 en tres preparaciones óseas diferentes concuerdan con la capacidad osteoinductora demostrada *in vivo* en ratas atímicas.

Ejemplo de referencia 2

25 Se prepara una cantidad de 60 g de partículas de hueso desmineralizado a partir de hueso del tercio externo de un hueso largo. Se prepara una cantidad de 40 g de partículas de hueso desmineralizado a partir de hueso de los dos tercios internos de un hueso largo. Estas dos cantidades se mezclan uniformemente, y luego se distribuyen uniformemente en glicerol como soporte.

Ejemplo 3

30 Se prepara una cantidad de 50 g de partículas de hueso desmineralizado a partir de hueso de los dos tercios externos de un hueso largo. Éstas se distribuyen en glicerol como soporte.

Ejemplo de referencia 4

35 Se prepara una cantidad de 60 g de fibras de hueso desmineralizado a partir de hueso del tercio externo de un hueso largo. Se prepara una cantidad de 40 g de partículas de hueso desmineralizado a partir de hueso de los dos tercios internos de un hueso largo. Estas partículas y fibras de hueso se mezclan y distribuyen en glicerol como soporte.

Ejemplo 5

40 Se prepara una cantidad de 70 g de fibras de hueso desmineralizado a partir de hueso del 20% externo de un hueso largo. Este material se distribuye en glicerol como soporte.

Ejemplo de referencia 6

45 Se prepara una cantidad de 50 g de partículas de hueso desmineralizado a partir de hueso del 40% externo de un hueso largo. Se prepara una cantidad de 30 g de fibras de hueso desmineralizado a partir de hueso del 60% interno de un hueso largo. Las fibras de hueso desmineralizado se prensan. Las partículas y fibras de hueso se mezclan y luego se distribuyen en glicerol como soporte.

Ejemplo de referencia 7

50 Se prepara una cantidad de 80 g de fibras de hueso desmineralizado a partir de hueso del tercio externo de un hueso largo. Las fibras de hueso desmineralizado se prensan. Se prepara una cantidad de 40 g de partículas de hueso superficialmente desmineralizado a partir de hueso de los dos tercios internos de un hueso largo. Estas partículas y fibras de hueso se mezclan y distribuyen en glicerol como soporte.

Ejemplo de referencia 8

5 Se prepara una cantidad de 80 g de fibras de hueso desmineralizado y de partículas de hueso desmineralizado a partir de hueso del 40% externo de un hueso largo. Se prepara una cantidad de 50 g de astillas de hueso superficialmente desmineralizado a partir de hueso del 60% interno de un hueso largo. Estas partículas, fibras y astillas de hueso se mezclan y distribuyen en glicerol como soporte.

Ejemplo de referencia 9

10 Se prepara una cantidad de 60 g de astillas de hueso desmineralizado a partir de hueso del tercio externo de un hueso largo. Se prepara una cantidad de 30 g de fibras de hueso desmineralizado a partir de hueso de los dos tercios internos de un hueso largo. Estas astillas y partículas de hueso se mezclan y distribuyen en glicerol como soporte.

X. Conclusión

15 Los datos contenidos en la presente memoria describen el diferente potencial osteoinductor de matriz de hueso desmineralizado que surge de capas diferentes de hueso cortical. La DBM derivada de la capa externa/perióstica de hueso tiene una mayor capacidad osteoinductora que la DBM derivada de la capa media la cual, a su vez, tiene una mayor capacidad osteoinductora que la DBM derivada de la capa interna/endóstica del hueso.

20 Se proporciona una composición de DBM que comprende DBM derivada de la capa externa/perióstica de hueso, y sustancialmente exenta de hueso derivado de las capas media e interna/endóstica. Una composición de DBM producida a partir de hueso de la capa perióstica tiene un contenido de BMP-2, sin adición de factor de crecimiento exógeno o extracto de DBM, que excede del de una composición de DBM de hueso derivado de las otras capas o de una mezcla de capas. Esto aplica al contenido de BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 y TGF-beta.

25 Aunque las composiciones de DBM proporcionadas en la presente memoria, derivadas de la capa externa/perióstica y sustancialmente exentas de hueso derivado de la interna/endóstica, pueden usarse sin otros aditivos, se entiende que la DBM puede contener soportes, excipientes, extractos y/o factores de crecimiento. Además, las composiciones de DBM según la invención pueden estar incluidas en un dispositivo soporte o prótesis para formar un implante que proporcione una plataforma para la osteogénesis y que dé lugar al crecimiento de hueso nuevo.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición de matriz ósea desmineralizada derivada de hueso cortical, que comprende una capa perióstica, una capa media y una capa endóstica, composición que comprende un porcentaje desproporcionado de hueso cortical derivado de la capa perióstica, donde el porcentaje desproporcionado derivado de la capa perióstica es una cantidad de hueso de la capa perióstica que excede de la cantidad esperada si se moliera el hueso entero, y donde la matriz ósea desmineralizada está sustancialmente exenta de hueso derivado de la capa endóstica.
- 2.** La composición de matriz ósea desmineralizada según la reivindicación 1, que además incluye un excipiente.
- 3.** La composición de matriz ósea desmineralizada según la reivindicación 1, que además incluye un soporte.
- 10 **4.** La composición de matriz ósea desmineralizada según la reivindicación 3, donde el soporte se selecciona del grupo que consiste en: un polirol, un polisacárido, un hidrogel, un polímero y sus combinaciones.
- 5.** La composición de matriz ósea desmineralizada según la reivindicación 1, que además incluye un factor de crecimiento.
- 15 **6.** Un método para producir una composición osteoinductora, método que comprende: obtener hueso cortical que comprende un porcentaje desproporcionado de hueso desmineralizado de una capa perióstica, donde el hueso cortical comprende la capa perióstica, una capa media y una capa endóstica, y donde el porcentaje desproporcionado derivado de la capa perióstica es una cantidad de hueso de la capa perióstica que excede de la cantidad esperada si se moliera el hueso entero, y donde la obtención del hueso cortical que comprende el porcentaje desproporcionado de hueso desmineralizado de la capa perióstica comprende: moler hueso de la capa perióstica; moler hueso de la capa media; moler hueso de la capa endóstica; y separar el hueso molido de la capa perióstica; y desmineralizar el hueso cortical.
- 20 **7.** El método según la reivindicación 6, que además comprende añadir el hueso cortical desmineralizado a un soporte.
- 8.** El método según la reivindicación 6, que además comprende añadir el hueso cortical desmineralizado a un excipiente.
- 25 **9.** El método según la reivindicación 6, que además comprende añadir un factor de crecimiento al hueso desmineralizado.
- 10.** El método según la reivindicación 6, que además comprende añadir un extracto al hueso desmineralizado.
- 30 **11.** El método según la reivindicación 6, que además comprende separar el hueso molido de la capa media, desmineralizar el hueso molido de la capa media, y combinar el hueso desmineralizado de la capa perióstica y el hueso desmineralizado de la capa media.
- 12.** El método según la reivindicación 6, donde la molienda del hueso de la capa perióstica produce partículas de un primer tamaño y la molienda del hueso de la capa media produce partículas de un segundo tamaño y donde el primer tamaño y el segundo tamaño no son los mismos.

35

FIG. 1a

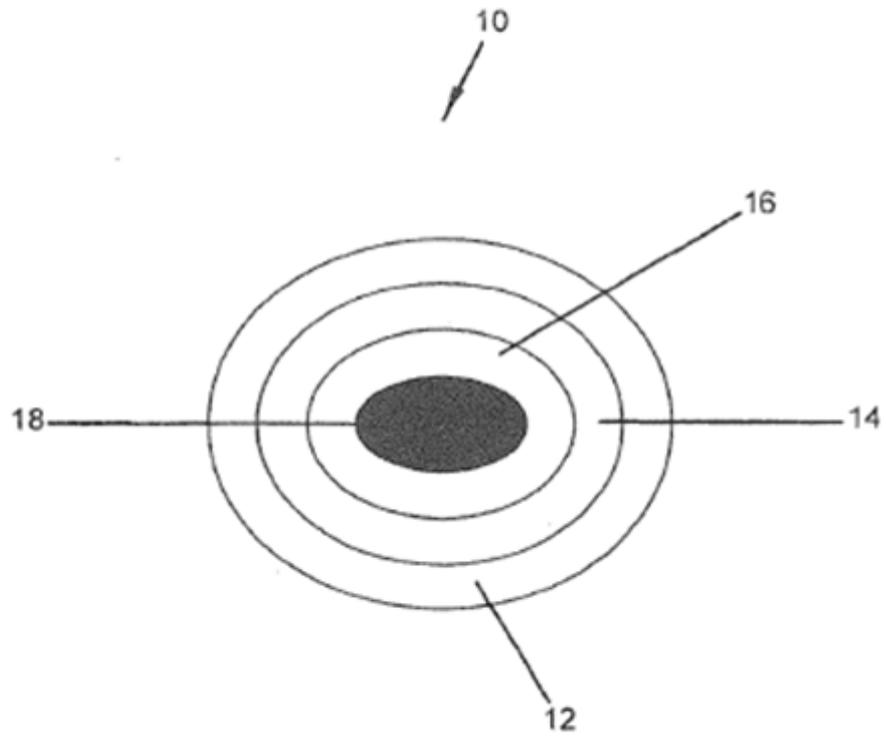


FIG. 1b

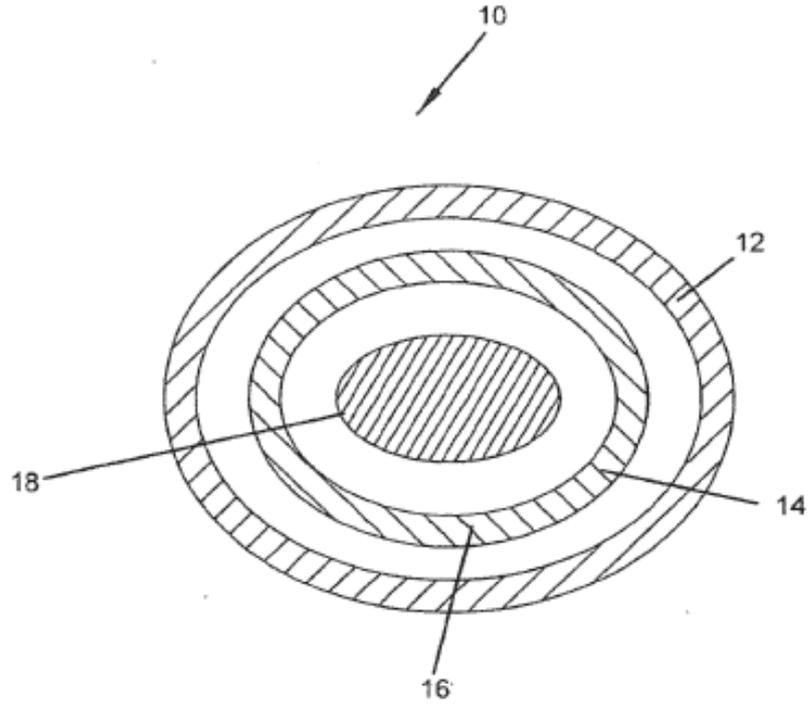


FIG. 1c

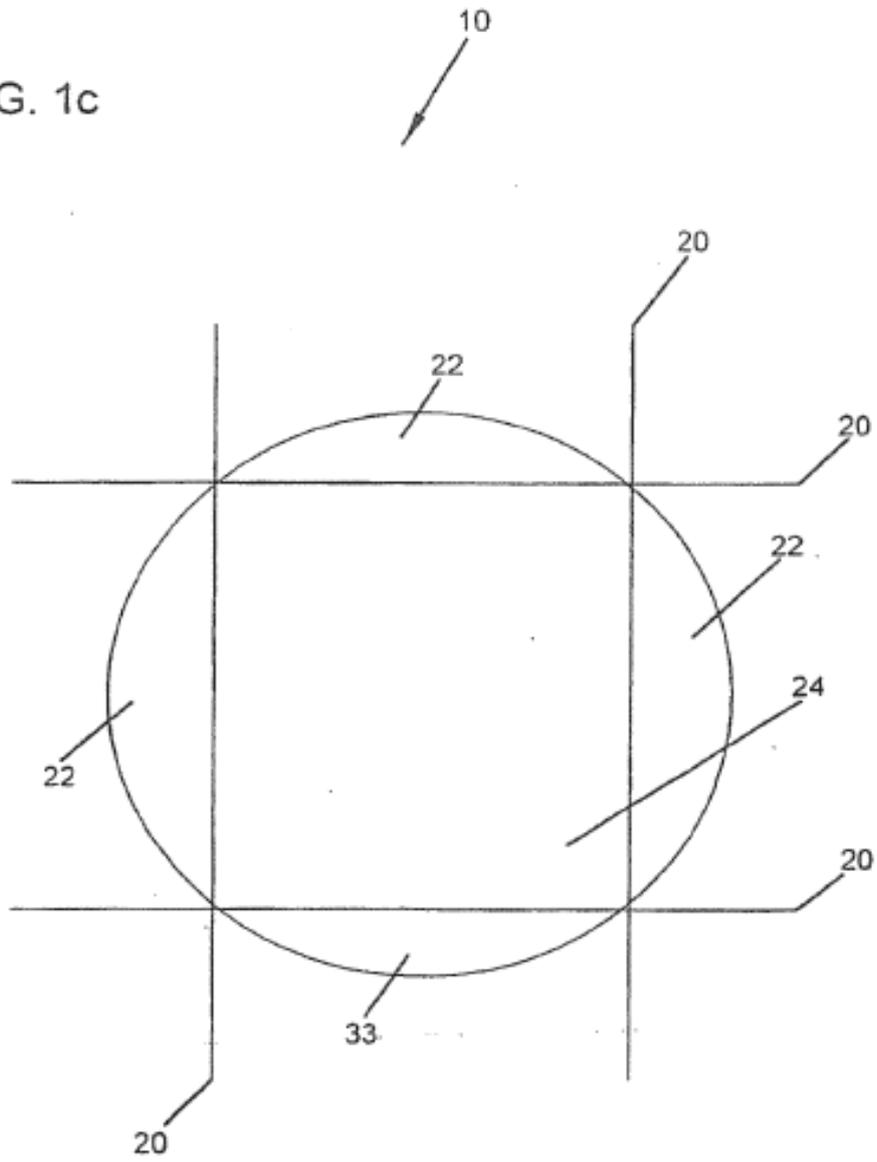


FIG. 2



FIG. 3

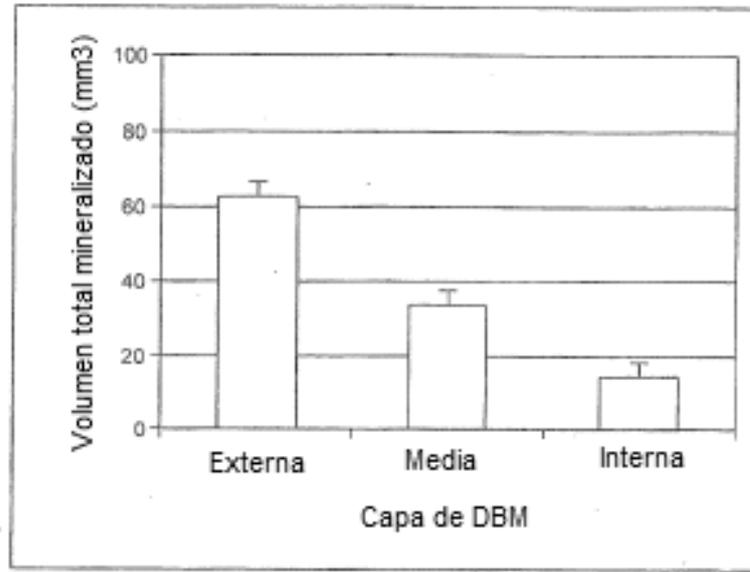


FIG. 4

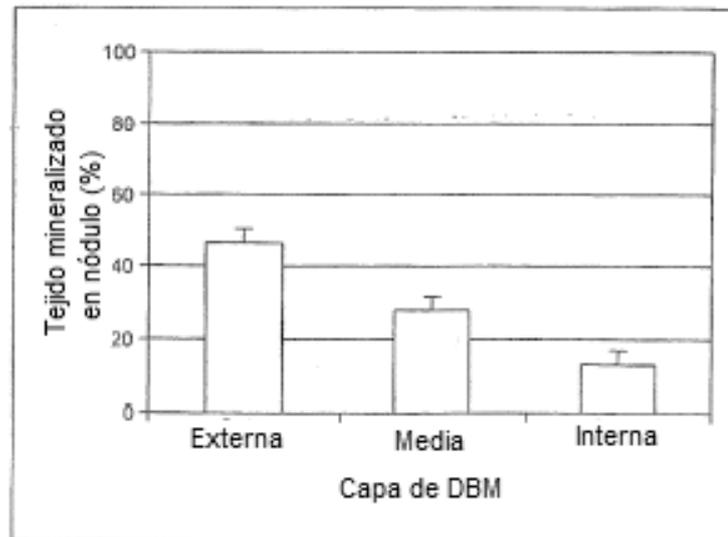


FIG. 5

Resultados OI

	Capa externa	Capa media	Capa interna
OI (media)	3,17	2,50	1,83
OI (SD)	0,41	0,55	0,41
Nº de implantes	6	6	6
Valor p (Kruskall Wallis)	0,0087		

FIG. 6

