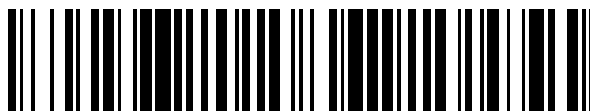


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 668**

51 Int. Cl.:

A61K 35/32 (2015.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61L 24/00 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2011 E 11729961 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2585083**

54 Título: **Una preparación de proteína ósea en una matriz de polietilenglicol/glicerol**

30 Prioridad:

01.04.2011 EP 11160828
28.06.2010 EP 10167448

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2015

73 Titular/es:

BBS - BIOACTIVE BONE SUBSTITUTES OY
(100.0%)
Aalentie 5
90240 Oulu, FI

72 Inventor/es:

TÖLLI, HANNA;
NÄRHI, JUHA-MATTI;
LUMME, HARRI;
BIRR, ELLI;
HIETALA, OILI;
VIITANEN, MIKKO;
HAIKOLA, MERJA;
JALOVAARA, PEKKA y
SANDSTRÖM, BO KENNETH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 552 668 T3

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

DESCRIPCIÓN

Una preparación de proteína ósea en una matriz de polietilenglicol/glicerol

Una matriz de polietilenglicol/glicerol de preparación ósea

- 5 Los ejemplos descritos aquí se refieren a métodos para preparar preparaciones de proteína ósea. Varias realizaciones de la presente invención se refieren a preparaciones de proteína ósea obtenidas por estos métodos, y a composiciones que contienen una o más de estas preparaciones, incluyendo dispositivos osteogénicos.

Antecedentes de la invención

- 10 En los campos quirúrgicos ortopédicos y periodontales es muy deseable encontrar sistemas eficientes para tratar pacientes con trastornos y deformaciones esqueléticas, que incluyen la reparación de grandes defectos óseos que se originan de trauma, escisión de tumores y malformaciones congénitas, la reconstrucción de masas óseas desgastadas por una endoprótesis implantada en operaciones de revisión y fracturas sin unir o de curación retrasada.

- 15 El injerto autólogo ("autoinjerto") es el enfoque tradicional para la reparación ósea, pero la cosecha de injertos óseos puede conducir a complicaciones, tales como sangrado, dolor e infección. Los autoinjertos tienen también disponibilidad limitada de este modo, como alternativa, se usan muchos materiales inorgánicos. Los fosfatos de calcio tales como hidroxiapatito (HAP) y fosfatos de tricalcio (TCP) y sus variaciones son materiales substitutos del hueso comúnmente conocidos. Estos materiales proporcionan una estructura osteoconductiva para la formación de nuevo hueso.

- 20 La bioactividad de materiales inorgánicos se puede incrementar añadiendo estímulo osteogénico al extensor de injerto óseo. Se ha mostrado que los aloinjertos, matrices óseas desmineralizadas (DBM) y extractos óseos nativos aumentan la capacidad de curación del hueso y mejoran la integración en muchos estudios diferentes. Se ha demostrado que las combinaciones de factores de crecimiento derivados de hueso bovino en colágeno y soportes de DBM y de HAP coralino son tan buenas como los autoinjertos de cresta ilíaca cuando se estudian como tasas de fusión en artrodesis espinal en conejos y monos.

- 25 Se han desarrollado biomateriales sintetizados comercialmente disponibles y se pueden usar como material de relleno o soporte incrustado así como superpuesto. Por desgracia, estos materiales carecen de la actividad biológica necesaria para iniciar la regeneración ósea. Los soportes sintéticos preparados a partir de tales materiales que incluyen poli(ácidos lácticos) y ácidos hialurónicos se describen por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5 366 508. La proteína morfogenética ósea (BMP) se considera un factor importante en dispositivos osteogénicos y participa activamente en el proceso de implantación.

- 30 El documento EP 0 883 410 B1 describe un método para producir el complejo de proteína morfogenética ósea (BMP) modificada para un dispositivo osteogénico en el que el complejo de BMP modificada es obtenible por un método que comprende las etapas de (a) pulverizar material óseo desmineralizado; (b) extraer el material óseo en la etapa (a) con hidrocloreuro de guanidinio (GuHCl); (c) realizar una filtración usando un sistema de flujo tangencial; (d) 35 realizar una filtración en gel por la que es obtenible un complejo de BMP parcialmente purificada que muestra tres picos que comprenden tres fracciones de proteína, que se caracterizan por tener diferentes pesos moleculares, siendo la Fracción I una proteína de alto peso molecular (100-700 kD) con la actividad de BMP osteoinductiva, siendo la Fracción II una proteína inmunógena de Pm medio (25-55 kDa) que carece de actividad de BMP y siendo la Fracción III una proteína de un Pm bajo (15-25 kDa) con actividad de BMP osteoinductiva; y (e) retirar de la BMP 40 parcialmente purificada una fracción de proteína con propiedades inmunógenas e inflamatorias que tienen un Pm de 25-55 kD tal como se determina por filtración en gel.

Ulmanen et al. (LIFE SCIENCES vol.77, no.19, p.2425-2437, 2005) describe la inducción de la formación de hueso ectópico por medio de proteínas morfogenéticas óseas en cápsulas de gelatina.

- 45 La necesidad de más materiales osteogénicos que son útiles para una variedad de aplicaciones de reparación ósea, especialmente, materiales que son compatibles con los materiales de soporte típicamente usados en las aplicaciones descritas anteriormente, es manifiesta.

Sumario de la invención

- 50 Se descubrió sorprendentemente que un extracto de proteína ósea que contiene factores de crecimiento, entre otras proteínas, proporciona propiedades osteogénicas únicas. El extracto de proteína ósea, por ejemplo, puede acelerar la desorción de una estructura o soporte, en el que se incorpora el extracto.

Por consiguiente, varios ejemplos incluyen métodos para preparar una preparación de proteína ósea, en los que los métodos se practican por:

a) desmineralizar el hueso y extraer la matriz ósea con hidrocloreuro de guanidina para obtener un extracto de proteína ósea,

b) filtrar el extracto con un microfiltro con tamaño de corte suficiente para retirar partículas grandes y material no proteínico pero permitir que pasen las proteínas,

c) filtrar la fracción no retenida con un ultrafiltro de cartucho que tiene un tamaño de corte de alrededor de 5-10 kD para recuperar la preparación de proteína ósea.

- 5 Varios ejemplos descritos aquí comprenden una preparación de proteína ósea obtenida por uno más de los métodos anteriormente mencionados.

La invención proporciona una preparación de proteína ósea obtenida por un método que comprende:

a) desmineralizar un hueso y extraer la matriz ósea con hidrocloreto de guanidina como disolvente para obtener un extracto de proteína ósea,

- 10 b) filtrar el extracto con un microfiltro de tamaño de corte en el intervalo de 0,1-10 μ m (valor micrométrico nominal) suficiente para retirar grandes partículas y material no proteínico pero permitir que pasen las proteínas,

c) filtrar la fracción no retenida con un ultrafiltro de cartucho que tiene un tamaño de corte de 5-10 kDa para recuperar la preparación de proteína ósea.

en el que la preparación de proteína ósea obtenida se incorpora en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG/GLY).

- 15 Algunos ejemplos incluyen una preparación de proteína ósea que contiene factores de crecimiento, factores de diferenciación y moléculas de señalización que proporcionan, cuando se combinan, un efecto y/o actividad sinérgica que puede ser útil para propósitos osteoinductivos, por ejemplo, promover ventajosas propiedades de inducción ósea. Los factores de crecimiento, factores de diferenciación y moléculas de señalización pueden incluir proteínas definidas aquí, como la(s) proteína(s) morfogenética(s) ósea(s) (BMP) y proteínas que se encuentran en extractos
- 20 óseos desmineralizados nativos. En un ejemplo se obtiene la preparación de proteína ósea que contiene factores de crecimiento, factores de diferenciación y moléculas de señalización con cualquier método descrito aquí.

Los aspectos de la presente invención también incluyen una preparación de proteína ósea que contiene una o más de las proteínas descritas aquí incorporadas en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY), por ejemplo, algunas realizaciones comprenden o consisten esencialmente en una proteína Gla de la matriz, SPP-24

25 (fosfoproteína secretada), BMP-2, BMP-7 y/o TGF-beta 1.

Los aspectos de la invención también incluyen pastas o geles, tales como una pasta o gel inyectable, que comprende una o más de las preparaciones de proteína ósea descritas aquí incorporada en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-Gly). La pasta o gel puede ser moldeable, forma que también se puede llamar masilla.

- 30 Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen una masilla, un pelet, un disco, un bloque o un gránulo que comprende una preparación de proteína ósea que comprende una o más de las proteínas descritas aquí incorporada en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-Gly), por ejemplo, algunas realizaciones comprenden o consisten esencialmente en una proteína Gla de la matriz, SPP-24 (fosfoproteína secretada), BMP-2, BMP-7 y/o TGF-beta 1.

- 35 Algunas realizaciones también incluyen un dispositivo osteogénico, tal como un implante óseo, que contiene una o más de las preparaciones de proteína ósea descritas aquí incorporada en una matriz de polietilenglicol/glicerol (GLY-PEG), tal como una matriz porosa de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY). Es decir, algunas realizaciones son dispositivos osteogénicos que comprenden una o más de las proteínas descritas aquí en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY), por ejemplo, algunas realizaciones comprenden o consisten esencialmente en una proteína Gla de la matriz, SPP-24 (fosfoproteína secretada), BMP-2, BMP-7 y/o TGF-beta 1.

- 40 En algunos ejemplos, una o más de las preparaciones de proteína ósea descritas aquí se pueden usar para tratar, mejorar, inhibir, o prevenir un trastorno o estado relacionado con defectos óseos, de cartílago, tendón o diente, en el que se desea su regeneración, reparación o crecimiento, tal como el cáncer.

- 45 Algunos ejemplos descritos aquí incluyen una composición farmacéutica que contiene una o más de las preparaciones de proteína ósea descritas aquí. Estas composiciones farmacéuticas se pueden usar para tratar, mejorar, inhibir, o prevenir un trastorno o estado relacionado con defectos óseos, de cartílago, tendón o dientes, en el que se desea su regeneración, reparación o crecimiento, tal como el cáncer.

- 50 En algunos ejemplos, se contemplan métodos para inducir la formación de hueso, cartílago, tendón, o diente, in vitro o in vivo, y estos métodos se practican proporcionando o administrando una o más de las preparaciones óseas descritas aquí (deseablemente, en un dispositivo osteogénico o matriz apropiada) a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, un ser humano o animal (incluyendo animales domésticos y de compañía). Opcionalmente, el sujeto se puede identificar o clasificar como un sujeto que necesita un agente que induce la formación de hueso, cartílago, tendón, o diente y tal evaluación puede ser realizada por el diagnóstico clínico de un médico, dentista o cirujano. Opcionalmente, estos métodos también incluyen el análisis, observación, medida o evaluación clínica de la formación de hueso, cartílago, tendón, o diente antes y/o después de proporcionar o administrar una o más de las preparaciones óseas descritas aquí (deseablemente, en un dispositivo osteogénico o matriz apropiada) para el

sujeto que lo necesite.

En más ejemplos, se contemplan métodos para tratar, mejorar, inhibir, o prevenir un trastorno o estado relacionado con los defectos óseos o de cartílago, tales como el cáncer. Estos métodos se pueden practicar proporcionando o administrando una o más de las preparaciones óseas descritas aquí (deseablemente, en un dispositivo osteogénico o matriz apropiada) a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, un ser humano o animal (incluyendo los animales domésticos y de compañía). Opcionalmente, el sujeto se puede identificar o clasificar como un sujeto que necesita un agente que trata, mejora, inhibe, o previene un trastorno o estado relacionado con los defectos óseos o de cartílago, tal como cáncer, y tal evaluación se puede realizar por diagnóstico clínico por un médico, dentista o cirujano. Opcionalmente, estos métodos también incluyen el análisis, observación, medición o evaluación clínica de la formación de hueso, cartílago, tendón, o dientes antes y/o después de proporcionar o administrar una o más de las preparaciones óseas descritas aquí (deseablemente, en un dispositivo osteogénico o matriz apropiada) para el sujeto que lo necesite. Opcionalmente, estos métodos también incluyen el análisis, observación, medición, o evaluación clínica de la progresión, inhibición, mejora o tratamiento de la enfermedad, trastorno, o estado asociado a la misma y estos análisis, observaciones, o mediciones se pueden hacer por evaluación clínica o enfoques de diagnóstico.

En todavía más realizaciones, uno o más de los extractos de proteínas óseas descritos aquí incorporados en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY) se combinan con una estructura o soporte, tal como fosfato de tricalcio o sulfato de calcio, y la composición resultante se usa para acelerar la desorción de la estructura o soporte, mejorando por ello el proceso de curación del hueso, en un sujeto que necesite curación del hueso. Por consiguiente, se contemplan métodos para acelerar la formación de hueso, cartílago, tendón, o dientes, in vitro o in vivo, y estos métodos se practican por proporcionar o administrar una composición que comprende uno o más de los extractos de proteínas óseas descritos aquí y fosfato de tricalcio o sulfato de calcio a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, un ser humano o animal (incluyendo los animales domésticos y de compañía). Opcionalmente, el sujeto puede ser identificado o clasificado como un sujeto que necesita un agente que acelera la formación de hueso, cartílago, tendón, o dientes y tal evaluación se puede realizar por diagnóstico clínico de un médico, dentista o cirujano. Opcionalmente, estos métodos también incluyen el análisis, observación, medición o evaluación clínica de la, formación del cartílago, tendón, o diente antes y/o después de proporcionar o administrar una o más de las preparaciones óseas descritas aquí (deseablemente, en un dispositivo osteogénico o matriz apropiada) al sujeto que lo necesite.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los cambios en el flujo de filtrado durante la filtración de 1000 kDa. El volumen total del lote era de 45 litros.

La Figura 2 muestra la concentración de proteína total (mg/ml) en las corrientes de filtrado y fracción retenida durante la microfiltración. El muestreo se realizó siempre cuando se acumularon cuatro litros de filtrado y en el punto final.

La Figura 3 muestra las velocidades de flujo durante la ultrafiltración a través de filtros de tipo V de 10 kDa. A representa un lote de 22 litros y B un lote de 23 litros.

La Figura 4 muestra un análisis de SDS-PAGE del filtrado final de la filtración a través del filtro de cartucho de tipo V de 10 kDa (línea 2). La electroforesis se efectuó usando condiciones reducidas y voltaje constante de 200 V durante 50 minutos. Los tamaños de proteínas de peso molecular estándar (línea 1) comenzando desde arriba son de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa.

La Figura 5 muestra la determinación del flujo crítico para microfiltración. Flujo (arriba) y TMP (abajo) a caudales transversales iniciales de 1,15 l/min (A) y 1,66 l/min (B).

La Figura 6 muestra la determinación del flujo crítico para microfiltración a través de un filtro de cartucho de 1000 kDa. Flujo (arriba) y TMP (abajo) a caudales transversales iniciales de 2,15 l/min (A) y 2,75 l/min (B).

La Figura 7 muestra las curvas de optimización de flujo vs. TMP en el caso de VCF 1 para el filtro de cartucho de ultrafiltración de tipo V de 10 kDa. Los caudales transversales iniciales usados eran 1,15 l/ml (A), 1,66 l/min (B), 2,15 l/min (C) y 2,75 l/min (D).

La Figura 8 muestra la optimización del flujo vs. TMP en el caso de VCF 10 para el filtro de cartucho de ultrafiltración del tipo V de 10 kDa. Los caudales transversales iniciales usados eran 1,66 l/min (A) y 2,75 l/min (B).

La Figura 9 muestra el resumen del modelo ajustado usando el método de mínimos cuadrados parcial (PLS) en MODDE. Las dos respuestas en el modelo eran tiempo y concentración de proteína (rendimiento).

La Figura 10 muestra el efecto de los parámetros estudiados en la duración de las ultrafiltraciones diseñadas usando software MODDE. La abreviatura "pum" se refiere a velocidad de bombeo, "ret" a estrangulamiento de la fracción retenida, "Temp" a temperatura de filtración, "Mem(A)" a membrana A (Biomax tipo C, filtro de poliétersulfona) y

“(Mem(B)” a membrana B (Ultracel tipo C, filtro de celulosa regenerada).

La Figura 11 muestra perfiles de proteína de cuatro filtrados de ultrafiltraciones diseñadas usando software MODDE. El análisis SDS-PAGE se efectuó usando condiciones no reductoras y voltaje constante de 200 V durante 50 minutos. Línea 1: peso molecular estándar, línea 2: filtrado del experimento 1 (membrana B), línea 3: filtrado del experimento 4 (membrana B), línea 4: filtrado del experimento 7 (membrana A) y línea 5: filtrado del experimento 10 (membrana A). Los tamaños de las proteínas de peso molecular estándar (línea 1) comenzando desde arriba son 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa.

La Figura 12 muestra las curvas para la optimización de flujo versus TMP para cartucho de ultrafiltración de tipo C Biomax. El VCF era 1 y los caudales transversales iniciales 0,945 l/min (A), 1,125 l/min (B) y 1,350 l/min (C).

La Figura 13 muestra las curvas para la optimización de flujo versus TMP para cartucho de ultrafiltración de tipo C Biomax. El VCF era 5 y los caudales transversales iniciales 0,945 l/min (A) y 1,350 l/min (B).

La Figura 14 muestra las curvas para la optimización del flujo versus TMP para cartucho de ultrafiltración de tipo C Ultracel. El VCF era 1 y los caudales transversales iniciales 0,730 l/min (A), 0,945 l/min (B) y 1,125 l/min (C).

La Figura 15 muestra las curvas para la optimización del flujo versus TMP para cartucho de ultrafiltración de tipo C Ultracel. El VCF era 5 y los caudales transversales iniciales 0,945 l/min (A) y 1,125 l/min (B).

La Figura 16 muestra la recuperación de filtros NWP de tipo C Biomax y Ultracel después del ciclo de limpieza con NaOH 0,1 M a 37°C durante 30 minutos. Las filtraciones anteriores se realizaron usando un volumen de alimentación de 3 l para VCF de 10.

La Figura 17 muestra un diagrama de una configuración ejemplar en un procedimiento de fabricación a pequeña escala.

La Figura 18 muestra un diagrama de flujo de un procedimiento ejemplar para la obtención del extracto de proteína ósea.

La Figura 19 muestra un SDS-PAGE de extracto nativo desmineralizado con ácido fórmico. Las bandas de proteínas se aislaron de SDS-PAGE y se analizaron con MS-MALDI-TOF

La figura 20 muestra un SDS-PAGE de extracto nativo desmineralizado con HCl. Las bandas de proteínas se aislaron de SDS-PAGE y se analizaron con MS-MALDI-TOF

La Figura 21 muestra los volúmenes óseos medidos a partir de imágenes micro-CT. En las comparaciones estadísticas todos los otros grupos eran significativamente mejores que la matriz ósea desmineralizada (DBM Grafton Plus®) grupo (^ap <0,02). Todos los grupos de implante de extracto de proteína ósea, el grupo de autoinjerto y también otros grupos de control, excepto el grupo de DBM se habían curado significativamente mejor que los defectos no tratados (^bp <0,02). El grupo de autoinjerto era significativamente mejor en volumen óseo que el grupo de pasta 4 (^cp <0,02). Los grupos de control se han marcado como dibujo de picaduras.

La Figura 22 muestra el examen histológico que muestra la bioactividad y la formación de nuevo hueso para una dosis de 3 mg de extracto de proteína ósea de reno en una cápsula de gelatina en el modelo de bolsa de ratón. B = hueso. (Aumento original 10x).

La Figura 23 muestra el examen histológico que muestra la formación de nuevo hueso y la respuesta del implante en el modelo de bolsa de ratón usando diferentes soportes con el extracto de proteína ósea de reno: (a) HAP/TCP/CS 30:60:10 activo, (b) HAP/TCP/CS 30:60:10 control sin extracto de proteína ósea, (c) CS hemihidrato activo, (d) CS hemihidrato de control (e) CS dihidrato + ácido esteárico activo, y (f) CS dihidrato de control + ácido esteárico. C= células del cartílago calcificado, B = hueso, M = músculo, F = tejido fibrótico, e I = soporte de implante. (Aumento original 10x).

La figura 24 muestra la evaluación radiográfica de la formación de nuevo hueso en el modelo de bolsa de ratón usando diferentes soportes con el extracto de proteína ósea de reno. El control sin el extracto de proteína ósea estaba localizado en el lado derecho, y el implante activo estaba localizado en el lado izquierdo: (a) HAP/TCP/CS 30:60:10, (b) CS hemihidrato, y (c) CS dihidrato + ácido esteárico.

La figura 25 muestra ejemplos de μ CT de CS activa (P2.1) y grupos de control de CS (P2.2) después de 3 semanas de seguimiento. Los pellets se han reabsorbido y se ve alguna formación de hueso.

La figura 26 muestra ejemplos de μ CT de CS activa (P7.1) y grupos de control (P3U.3) después de 8 semanas de seguimiento. Se ve más formación de hueso en el lado activo comparado con el lado de control.

La figura 27 muestra ejemplos de μ CT de β -TCPId activo (P2.3) y grupos de control (P2.4) después de 3 semanas de seguimiento. Se puede ver alguna formación de hueso alrededor de los gránulos. La resorción de gránulos es todavía lenta.

- La figura 28 muestra ejemplos de μ CT de β -TCPId activo (P7.3) y grupos de control (P7.4) después de 8 semanas de seguimiento. La mayor parte de los gránulos de TCP se han reabsorbido en el lado activo y reemplazado por nuevo hueso. En el lado de control los gránulos se han reabsorbido más lentamente y la formación de hueso se puede encontrar solamente alrededor de los gránulos. Hay claramente más formación de hueso en el grupo activo que en el grupo control.
- La figura 29 muestra un ejemplo de μ CT del grupo de β -TCPId activo después de 3 semanas de seguimiento. Los gránulos todavía no se reabsorbieron y se puede encontrar formación de hueso alrededor de los gránulos. No se encuentra ejemplo de control.
- La figura 30 muestra ejemplos de μ CT de β -TCPId activo (P9.1) y grupos de control (P10.3) después de 8 semanas de seguimiento. La formación de hueso es más efectiva y la resorción de gránulos es más rápida en el lado activo comparado con el lado de control.
- La Figura 31 muestra un ejemplo de μ CT del grupo de defecto vacío después de 3 semanas de seguimiento. El sitio del defecto está vacío y no se ve formación de hueso.
- La figura 32 muestra ejemplos de μ CT del grupo de defecto vacío después de 8 semanas de seguimiento. Se ve formación normal, muy minoritaria, de hueso en los bordes del defecto pero el defecto no se ha curado.
- La Figura 33 muestra un corte histológico de CS activo, después de 3 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = área de formación de nuevo hueso). Se ve poca formación de hueso.
- La Figura 34 muestra cortes histológicos de CS activo, después de 8 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = área de formación de nuevo hueso). Se ve mucha formación de hueso en el sitio del defecto.
- La figura 35 muestra un corte histológico de CS de control, después de 3 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, PR = restos de pellets). Se ven restos de pellets en el sitio del defecto pero sin signos de formación de nuevo hueso.
- La figura 36 muestra un corte histológico de CS de control, después de 8 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso). Se puede ver alguna formación de nuevo hueso en el sitio del defecto. Las secciones de los cortes no son axialmente paralelas al defecto.
- La figura 37 muestra un corte histológico de β -TCPId activo, después de 3 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). Se ve la resorción de los gránulos de partida y la formación de nuevo hueso alrededor de los gránulos.
- La Figura 38 muestra cortes histológicos de β -TCPId activo, después de 8 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). El defecto está bien lleno de nuevo hueso y se ve una marcada resorción de los gránulos.
- La figura 39 muestra un corte histológico de control de β -TCPId, después de 3 semanas de seguimiento (tinción de MG mancha, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). Hay solo signos minoritarios de resorción y formación minoritaria de nuevo hueso alrededor de los gránulos.
- La figura 40 muestra cortes histológicos de control de β -TCPId, después de 8 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). Se ven gránulos y formación de nuevo hueso alrededor de los gránulos. Pero la cantidad de formación de hueso es mucho menor y la resorción de gránulos mucho más lenta que la correspondiente al grupo activo de β -TCPId (Fig. 38).
- La figura 41 muestra un corte histológico de β -TCPId activo, después de 3 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). Se ve la resorción de gránulos de partida y la formación de nuevo hueso alrededor de los gránulos.
- La Figura 42 muestra cortes histológicos de β -TCPId activo, después de 8 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). Se ven pequeños restos de gránulos y excelente formación de nuevo hueso. El defecto está completamente lleno de nuevo hueso y la resorción de los gránulos es muy alta.
- La figura 43 muestra un corte histológico de control de β -TCPId, después de 3 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). La resorción de los gránulos es lenta y se ve formación minúscula de nuevo hueso alrededor de los gránulos.
- La figura 44 muestra cortes histológicos de control de β -TCPId, después de 8 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x, BF = formación de nuevo hueso, Gr = TCP-gránulo). Se ven gránulos y formación de nuevo hueso alrededor de los gránulos. La formación de hueso es mucho menor y la resorción de los gránulos es más lenta que en el grupo activo (Fig. 42).

La figura 45 muestra un corte histológico de defecto vacío, después de 3 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x). El defecto vacío está vacío.

La figura 46 muestra un corte histológico de defecto vacío, después de 8 semanas de seguimiento (tinción de MG, aumento original 6,3x). El defecto vacío está vacío (se ve alguna formación normal de hueso en los bordes del defecto).

La figura 47 muestra la resorción de gránulos del control TCPId (a la izquierda) y gránulos activos (a la derecha) (tinción de MG, aumento original 10x, Gr = gránulo de TCP).

La figura 48 muestra la resorción del control TCPPhd (a la izquierda) y gránulos activos (a la derecha) (tinción de MG, aumento original 10x, Gr = gránulo de TCP).

10 Descripción detallada de la invención

Los ejemplos descritos aquí se refieren a métodos para preparar una preparación de proteína ósea, en los que los métodos se practican:

a) desmineralizando el hueso y extrayendo la matriz ósea con un disolvente, tal como hidrocloreto de guanidina, para obtener un extracto de proteína ósea,

b) filtrando el extracto con un microfiltro con tamaño de corte suficiente para retirar grandes partículas y material no proteínico pero permitiendo que pasen las proteínas, y

c) filtrando la fracción no retenida con un ultrafiltro de cartucho que tiene un tamaño de corte de alrededor de 5-10 kDa para obtener la preparación de proteína ósea.

En un ejemplo el tratamiento con disolución de hidrocloreto de guanidina en la etapa a) se puede reemplazar con el tratamiento con disolución de urea que es un equivalente conocido. Se puede usar generalmente una disolución de hidrocloreto de guanidina 4 M.

El término "microfiltro" en la etapa b) se refiere a cualquier filtro apropiado que es suficiente para retirar dichas grandes partículas y material no proteínico pero permitir que pasen las proteínas. Esto se puede llamar también "clarificación" o "prefiltrado" que se realiza para retirar, por ejemplo, partículas en suspensión, coloides, macromoléculas, células y restos celulares de la disolución. Las moléculas de interés pasarán el microfiltro. Los ejemplos de tales filtros o métodos de filtración incluyen Normal Flow Filtration (NFF, Millipore) y Tangential Flow Filtration (TFF). Dicho tamaño de corte en la etapa b) puede estar en el intervalo de 0,1-10 μm (valor micrométrico nominal), por ejemplo, alrededor de 0,22-0,1 μm , o alrededor de 1000 kDa.

En la etapa c) de ultrafiltración puede ser útil incluso el intervalo de corte de 1-500 kDa. El ultrafiltro puede ser un filtro de celulosa regenerada o filtro de polietersulfona.

En un ejemplo la preparación de proteína ósea se dializa, por ejemplo, con agua, para concentrarla y purificarla adicionalmente.

En otro ejemplo la preparación de proteína ósea se dializa adicionalmente con una disolución de citrato para promover el plegamiento apropiado de las proteínas.

En otra realización más el hueso es hueso de mamífero. En otra realización más el hueso es hueso de reno. En otra realización más el hueso es hueso de cuerno. En otra realización más el hueso es hueso largo.

Los aspectos de la invención también incluyen una preparación de proteína ósea que contiene, por ejemplo, una o más proteínas que se encuentran en el extracto nativo desmineralizado con HCl, cuya preparación se describe aquí, que incluye biglicano, trombina, lamina A/C, vimentina, osteonectina, biglicano, lisil oxidasa, osteonectina, SPP-24 (fosfoproteína secretada), dermatopontina, condroadherina y/o proteína Gla de la matriz. Se contempla que por lo menos las siguientes proteínas promueven, inducen, o aceleran la osteoinducción: proteína Gla de la matriz, SPP-24 (fosfoproteína secretada), BMP-2, BMP-7 y/o TGF-beta 1. Por consiguiente, la composición de proteína ósea puede contener también por lo menos uno de los siguientes: biglicano, trombina, lamina A/C, vimentina, condroadherina, proteína de matriz extracelular 22K, lisil oxidasa, osteonectina, colágeno o dermatopontina en cantidades sustanciales.

En algunas realizaciones la composición de proteína ósea contiene por lo menos proteína Gla de matriz, biglicano, SPP-24 condroadherina, proteína de matriz extracelular 22K, lisil oxidasa, osteonectina, colágeno, BMP-2, BMP-7 y/o TGF-beta 1 incorporado en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY). Se puede incluir también una o más de las otras proteínas mencionadas aquí. La preparación de proteína ósea contiene dichas proteínas en cantidades sustanciales, por ejemplo, una cantidad suficiente para proporcionar un efecto fisiológico, tal como efecto o actividad osteoinductiva. También pueden estar presentes otras proteínas en cantidades traza, una cantidad tal demasiado baja para ser vista en un SDS-PAGE tintado o para ser secuenciada, y tales proteínas no son esenciales o requeridas para la actividad osteoinductiva o acelerante de la preparación o una composición que comprende dicha

preparación de proteína. La Tabla 14, por ejemplo, "Las proteínas en extracto nativo desmineralizado con HCl" proporciona orientación de cómo hacer una preparación ósea de la presente invención. Estas preparaciones se pueden obtener con el método descrito anteriormente, pero se puede usar también cualquier otro método.

5 En más ejemplos, la preparación de proteína ósea se incorpora o impregna en matriz, tal como una matriz porosa. La matriz, soporte o estructura, palabras que se pueden usar intercambiabilmente, mejora la actividad y potencial terapéutico del extracto de proteína ósea en el sitio de aplicación (por ejemplo, la matriz, soporte o estructura cuando se añade a un extracto de proteína ósea permite un desprendimiento gradual de proteínas activas y reduce la migración de estos factores).

10 Deseablemente, una matriz soporte cumple ciertos criterios. La matriz es preferentemente biocompatible, bioabsorbible, maleable, y esterilizable. Los materiales deseados son estructuralmente fuertes, inmunológicamente inertes, altamente osteoconductivos y variablemente biodegradables. Los ejemplos de conocidas matrices orgánicas e inorgánicas se describen por Kirker-Head, C.A: Potential applications and delivery strategies for bone morphogenic proteins. Advanced Drug Delivery Reviews 43 (2000) 65-92, and Moore et al., Synthetic bone graft substitutes, ANZ J. Surg. (2001) 71, 354-361.

15 En otra realización, una preparación de proteína ósea incorporada en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY) preparada como se describe aquí se incorpora en gránulos. En otra realización más, los gránulos son gránulos de β -fosfato de tricalcio (TCP), o los gránulos contienen β -fosfato de tricalcio. En otra realización más, los gránulos son gránulos de sulfato de calcio, o los gránulos contienen sulfato de calcio. En otra realización más, los gránulos son gránulos de hidroxiapatito, o los gránulos contienen hidroxiapatito. En otro ejemplo, la preparación de proteína ósea preparada como se describe aquí, se incorpora en una matriz. En otra realización más, la preparación de proteína ósea se incorpora en gránulos en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY). En una realización adicional, dicha preparación contiene ácido esteárico. Todas dichas realizaciones se pueden aplicar a cualquiera de las aplicaciones, métodos o usos descritos aquí.

25 En otra realización más, la preparación de proteína ósea incorporada en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY) preparada como se describe aquí está en forma de un liofilizado.

30 Algunas realizaciones también incluyen una pasta, tal como una pasta o gel inyectable, que comprende una o más de las preparaciones de proteína ósea descritas aquí incorporadas en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY). La pasta también puede ser moldeable, forma que también se puede llamar masilla. Por consiguiente, algunas realizaciones, incluyen una masilla que comprende una o más de las preparaciones de proteína ósea, preparadas por un método descrito aquí. Similarmente, algunas realizaciones incluyen un pelet, disco, bloque o gránulo que comprende una o más de las preparaciones de proteína ósea, preparado por un método descrito aquí. En otro ejemplo, la preparación de proteína ósea se proporciona en forma de un revestimiento sobre dicho pelet, disco, bloque o gránulo.

35 Varias realizaciones también incluyen un dispositivo osteogénico, tal como un implante óseo, que comprende una o más de las preparaciones de proteína ósea descritas aquí, incorporadas en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY).

40 Una realización proporciona la preparación de proteína ósea preparada como se describe aquí incorporada en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY) para uso como medicamento, por ejemplo, para tratar trastornos relacionados con defectos óseos, de cartílago, tendón o diente en los que se desea su regeneración, reparación o crecimiento, u otras enfermedades.

45 También se contemplan composiciones farmacéuticas que contienen dichas preparaciones de proteína ósea. Preferentemente dichas composiciones farmacéuticas contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más de las preparaciones de proteína ósea preparadas como se describe aquí y un vehículo, soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica se puede usar para tratar trastornos relacionados con defectos óseos, de cartílago, tendón o diente en los que se desea su regeneración, reparación o crecimiento, u otras enfermedades, tales como el cáncer.

50 Algunos ejemplos proporcionan un método para inducir la formación de hueso, cartílago, tendón, diente o similares, in vitro o in vivo, en los que dicho hueso, cartílago, tendón, diente o similares se trata con una o más de la preparaciones de proteína ósea descritas aquí, o con un dispositivo osteogénico u otra forma de aplicación que los contiene.

Los ejemplos adicionales incluyen métodos para tratar trastornos relacionados con defectos óseos o de cartílago, en los que se desea su regeneración, reparación o crecimiento u otras enfermedades, tales como el cáncer, administrando dicha preparación de proteína ósea aislada a un paciente que padece dichos trastornos.

55 "Trastornos relacionados con defectos óseos, de cartílago, tendón o diente" tal como se usa aquí, se refiere generalmente a cualquier trastorno conocido en el que se desea la curación o reconstrucción, por ejemplo, regeneración ósea, de cartílago, tendón o periodontal. Los ejemplos no limitantes de tratamientos de trastornos relacionados con defectos óseos, de cartílago, tendón o periodontales o enfermedades o similares son la

regeneración, reparación y crecimiento de tejido óseo y periodontal; la regeneración, reparación y crecimiento de hueso en mamíferos, tales como seres humanos o cualquier otro animal; tratamiento de las anomalías de la formación o regeneración ósea; cicatrización de heridas, la inducción de hueso ectópico y la curación de defectos óseos segmentarios en los vertebrados; tratamiento de trastornos y deformaciones esqueléticas; reparación de defectos óseos grandes originados por trauma, extirpación de tumores o malformaciones congénitas, la reconstrucción de masas óseas desgastadas por una endoprótesis implantada en operaciones de revisión y fracturas no unidas o de curación retrasada; reparación de defectos óseos y cartilagosos como defectos de tamaño crítico, defectos de tamaño no crítico, no unión segmentaria de fracturas; fracturas agudas, defectos condrales, defectos osteocondrales, defectos subcondrales; formación local de cartílago y hueso; defectos resultantes de enfermedades degenerativas; aplicaciones dentales, tales como reparación de tejidos periodontales, hueso alveolar, cemento dental, membrana de la raíz dental, llenado del canal de la raíz dental y la mejora o aumento de la fijación del implante dental. Los ejemplos de tales trastornos se pueden encontrar en Ann Rheum Dis, Volume 62, 2003, 73-78: Reddy AH: Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis and regeneration.

En una realización se proporciona un dispositivo osteogénico, tal como un implante, que contiene la preparación de proteína ósea en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG/GLY). El dispositivo osteogénico puede contener una matriz biocompatible, tal como un fosfato de calcio, carboximetilcelulosa o matriz de colágeno o sus combinaciones. En una realización, dicha matriz de fosfato de calcio es una matriz de hidroxiapatito. Dicha matriz puede proporcionar la liberación lenta de la preparación de proteína ósea y/o el medio apropiado para la presentación de la preparación de proteína ósea. El dispositivo osteogénico también puede contener un implante metálico rodeado por dicha matriz biocompatible. Un ejemplo de dicho metal es titanio. Algunos ejemplos de tales dispositivos osteogénicos se describen en el documento WO 98/51354. Los ejemplos no limitantes de los diferentes materiales de enmarcado, soportes o marcos para formar, por ejemplo, diferentes tipos de dispositivos osteogénicos o similares con la proteína de la presente invención son un medio en forma de polvo, esponja, tira, película, gel, banda o disolución o suspensión; vehículo líquido semisólido apropiado para inyección intramuscular, intravenosa, intramedular o intra-articular; células madre mesenquimales aisladas; cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable; auto- o alo-injerto encostrado; cualquier matriz farmacéuticamente aceptable; un material seleccionado del grupo que comprende hidroxiapatito, colágeno, polímeros (por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polímeros sintéticos, ácido hialurónico, α -BSM, fosfato de calcio, fosfato de tricalcio, biopolímeros cerámicos aporosos, biopolímeros reabsorbibles aporosos, coral, hueso desmineralizado, biovidrio, cualquier material biodegradable y sus combinaciones; agentes aglomerantes seleccionados del grupo que comprende manitol, dextranos, petrolato blanco, alquil- y metil-celulosas, agentes humectantes tales como sal de sodio, pegamento de fibrina, fibrinógeno y trombina de mamífero y sus combinaciones y mezclas. El dispositivo osteogénico puede ser, por ejemplo, un implante tridimensional estructuralmente estable en forma de cubo, cilindro o bloque o en la forma de una forma anatómica o una forma inyectable. Los ejemplos de dispositivos osteogénicos, materiales y técnicas útiles se describen en el libro "Skeletal reconstruction and bioimplantation" (T. Sam Lindholm, 1.997, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).

Un ejemplo adicional proporciona un método para inducir la formación de hueso, cartílago, tendón, diente o similares en el que dicho hueso, cartílago, tendón, diente o similares se trata con la preparación de proteína ósea, in vitro o in vivo. Otro ejemplo más proporciona un método para el tratamiento de los trastornos descritos en la memoria descriptiva que comprende administrar la preparación de proteína ósea a un paciente que padece dichos trastornos. Dicha preparación de proteína ósea se puede administrar en forma de una composición farmacéutica o de un dispositivo osteogénico descrito anteriormente. Se pueden administrar proteínas morfogenéticas u otros agentes útiles junto con dicha preparación de proteína ósea, como se describe anteriormente, para mejorar el efecto terapéutico.

Ejemplos

Optimización y aumento a escala de filtración de flujo tangencial de extracto de proteína ósea

El siguiente estudio está basado la tesis de máster "Optimization and scale-up of tangential flow filtration of bone protein extract", Viitanen, M. University of Oulu, 2010.

El propósito de este estudio era investigar la micro- y ultra-filtración de flujo tangencial de extracto de proteína ósea animal. Los procedimientos se optimizaron y basado en los resultados, se aumentaron a escala hasta la escala de producción.

En aplicaciones biofarmacéuticas la disolución que contiene los componentes deseados se somete a menudo a fraccionamiento y concentración. Usualmente estas etapas se llevan a cabo usando filtración. La filtración de flujo tangencial es una excelente elección para la filtración de grandes volúmenes, dado que el filtro no se bloquea tan fácilmente como en la tradicional filtración en línea. Esto es debido al flujo de alimentación que es paralelo a la membrana, y de este modo arrastra las partículas.

Durante este estudio los parámetros del procedimiento de micro- y ultra-filtración de extracto de proteína ósea se optimizaron para conseguir un procedimiento que fuera tan efectivo como fuese posible. También se compararon dos membranas diferentes y tipos de canal de alimentación para propósitos de ultrafiltración. Se usó un software

para el diseño de los experimentos y optimización para estudiar el efecto de las variables de procedimiento.

Los resultados muestran que el extracto de proteína ósea animal se puede procesar efectivamente usando filtración de flujo tangencial. El rendimiento de proteína era bueno, tanto en microfiltración como ultrafiltración. Ninguno de los materiales de membrana ensayados poseía significativo ensuciamiento. Sin embargo, había diferencias en los flujos máximos de filtración. Los procedimientos se podrían incluso optimizar adicionalmente. En base a los resultados obtenidos, se realizaron cálculos para el aumento a escala del procedimiento de filtración a la escala de producción. Los cálculos muestran que el procedimiento se puede llevar a cabo en el tiempo deseado y con costes razonables.

1 Introducción

La filtración de flujo tangencial se usa mucho en aplicaciones biofarmacéuticas y otras muchas otras aplicaciones industriales, por ejemplo, para concentrar o fraccionar proteínas por ultrafiltración o para retirar microorganismos y células por microfiltración. En este estudio se evaluó la microfiltración y ultrafiltración de extracto de proteína ósea. La filtración de flujo tangencial usando filtros de cartucho puede ser una técnica ideal para el procesado a gran escala de un extracto preparado de este tipo de tejido.

El estudio comenzó con un estudio de la viabilidad de las etapas tanto de microfiltración como de ultrafiltración. Se compararon diferentes filtros de cartucho para ultrafiltración. Se usó diseño sistemático y software de modelado (MODDE) para el diseño experimental. Se efectuó la optimización detallada de los parámetros del procedimiento para todos los filtros ensayados. Finalmente, se realizaron los cálculos para el aumento a escala del procedimiento en base a los resultados obtenidos.

No están disponibles muchos datos publicados acerca de resultados de experimentos de optimización que correspondan directamente con este estudio. La mayoría de ellos abarcan la ultrafiltración de suero de leche. Típicamente, este tipo de información es generada por compañías que tienen la filtración como una etapa del procedimiento. Por lo tanto, no está necesariamente publicada. Además, cada procedimiento de filtración biológica es único, con una solución específica de cada caso que implica la elección de material de membrana y otras características. El comportamiento del sistema es difícil de predecir y la optimización específica para cada caso es siempre necesaria.

2 Filtración de flujo tangencial

2.1 Descripción general de la filtración de flujo tangencial

La filtración en general se puede dividir en dos diferentes categorías operacionales. Son la filtración de flujo normal (NFF) y la filtración de flujo tangencial (TFF). En la NFF la disolución fluye por medio de presión o incluso de la gravedad en dirección perpendicular a la membrana o filtro de profundidad. Las partículas mayores de cierto tamaño serán retenidas sobre la superficie de la membrana o dentro del entramado del filtro de profundidad. Sin embargo, la acumulación de partículas finalmente bloqueará el filtro. La NFF se usa comúnmente para la filtración estéril y prefiltración antes de micro- o ultra-filtración.

En contraste con la NFF, la TFF utiliza el flujo de alimentación que es paralelo a la membrana. Esto crea un efecto de arrastre que previene el bloqueo de la membrana por partículas. El flujo de filtrado, que quiere decir el flujo que pasa la membrana, es generado por presión. Las moléculas menores que los poros de la membrana irán con el filtrado y las mayores se concentrarán en la corriente de la fracción retenida. Generalmente, la TFF se usa para concentrar disoluciones y/o separar moléculas o partículas en base a su diferencia de tamaño. La separación de moléculas a través de una membrana generalmente sigue una distribución gaussiana en el tamaño medio de los poros (valor de corte). Además del tamaño teórico de las moléculas, también la forma y carga tienen influencia en su paso a través de los poros (Millipore Corporation 1992). La siguiente sección se refiere a diferentes tipos de procedimientos de TFF, unidades de filtración, membranas y factores que tienen influencia sobre ellas, con especial atención dada a la ultrafiltración.

2.2 Definición de procedimientos de separación de membrana.

Los procedimientos de separación se pueden clasificar según el intervalo de tamaño de partículas a dividir. Las definiciones comúnmente usadas incluyen microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO), a la que se ha denominado también hiperfiltración en la bibliografía antigua. La filtración de partículas se usa a menudo como una etapa de prefiltración antes de la micro- o ultra-filtración para retirar grandes partículas sólidas y materiales coloidales que pueden provocar el bloqueo de los canales de alimentación de los filtros subsecuentes. Las fronteras entre las clases no son exactas.

2.2.1 Microfiltración

El corte (valor micrométrico nominal) de tamaño de poro de membrana usado en la mayoría de las microfiltraciones varía entre 0,1 y 10 μm . La microfiltración se usa para la separación de partículas suspendidas, coloides y macromoléculas de disoluciones. La microfiltración se usa ampliamente, por ejemplo, en la industria química y de minerales, y en aplicaciones de clarificación de agua. En la industria biotecnológica se usa a menudo para separar

células y restos de células del medio después del periodo de fermentación. Los productos pueden ser proteínas recombinantes, metabolitos de los organismos, y las células mismas, como en el cultivo de la levadura de pan. La MF se puede usar también como un método para la filtración estéril de disoluciones. En este caso, se usa comúnmente un tamaño de poro de corte de menos de 0,45 μm , o se puede escoger un corte de 0,2 μm si se desea la retención completa.

2.2.2 Ultrafiltración

La ultrafiltración es una excelente elección para concentrar y fraccionar proteínas. Este método es menos severo para proteínas comparado con la evaporación, y es más económico comparado con la filtración por permeación de gel. En UF, el intervalo de separación está entre 1 kDa y 500 kDa. Muchos fabricantes de membranas proporcionan cartuchos de UF con un corte hasta de 1000 kDa, equivalente a alrededor de 0,1 μm . El intervalo de presión en UF es típicamente de alrededor de 1,5-6,5 bar.

La UF se usa ampliamente en la industria biofarmacéutica en la purificación aguas abajo de anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes. La industria láctea fue una de las primeras en adoptar ampliamente esta técnica. Las aplicaciones típicas se encuentran en la fabricación de queso y en el fraccionamiento del suero de queso.

3 Metas del trabajo

Las metas de este trabajo eran examinar la idoneidad de filtros de cartucho de membrana para micro- y ultrafiltración de extracto de proteína ósea y para optimizar los procedimientos a pequeña escala. La selección del tipo de membrana era uno de los principales objetivos. El trabajo estaba más centrado en la ultrafiltración porque es más crítica y compleja desde el punto de vista de la optimización. La microfiltración servía principalmente como una etapa de purificación para la retirada de partículas y macromoléculas mayores que las proteínas típicas. Aunque categorizada como microfiltración en este trabajo, la etapa se ejecutó usando un filtro que tiene un tipo similar de membrana a los filtros usados para ultrafiltración. Sin embargo, el filtro tiene un tamaño de poro tan grande que la optimización se realiza como para microfiltros.

Primero, se realizaron experimentos de micro- y ultrafiltración preliminares usando un tipo de filtro. En base a los resultados y experiencia ganada, se escogieron dos nuevos ultrafiltros ligeramente diferentes para estudios adicionales. Se usó un programa para diseño experimental (MODDE) para examinar diferentes parámetros que tienen influencia en el procedimiento de ultrafiltración. Además del tipo de filtro, los parámetros estudiados fueron temperatura, presión y velocidad volumétrica de alimentación. Los filtros se expusieron a varios protocolos de optimización para encontrar los mejores puntos de ajuste y de este modo hacer el procedimiento a gran escala tan económico como sea posible. También se optimizó el procedimiento de microfiltración con respecto al flujo crítico. En todo el estudio la palabra flujo sola se refiere al flujo de filtrado.

La regeneración de las membranas después de la etapa de limpieza subsecuente a la filtración se estudió con métodos físicos y químicos. En base a los resultados, se evaluaron los métodos de limpieza. Finalmente, se realizaron cálculos para el aumento a escala del procedimiento usando los datos obtenidos de los experimentos a pequeña escala.

4 Equipo

Los experimentos de filtración se llevaron a cabo en la Universidad de Oulu, Kajaani University Consortium's Laboratory of Biotechnology en Sotkamo.

4.1 El equipo de filtración

4.1.1 Unidad BenchScale de Millipore

En este estudio, se usó exclusivamente la unidad Millipore BenchScale (Millipore Corp. USA) para propósitos de prefiltración y para medidas de integridad del filtro. La unidad tiene un recipiente de alimentación de dos litros, que se consideró demasiado pequeño para los volúmenes del lote del ensayo de filtración planeado. Se acopló un filtro de cápsula de prefiltración a la manguera de la bomba.

4.1.2 Unidad ProScale de Millipore

Los experimentos de filtración se llevaron a cabo usando la unidad ProScale de Millipore. Tiene un recipiente de alimentación de vidrio de diez litros. Si se necesitaran mayores volúmenes, la disolución se extrajo con sifón de un recipiente extra. En este caso la corriente de la fracción retenida se dirigió a este recipiente para asegurar la mezcla apropiada de la disolución. El calentamiento y enfriamiento de la unidad ProScale se consiguió por medio de hacer circular agua de grifo caliente o fría en el intercambiador de calor.

4.2 Membranas

Todas las membranas usadas en este estudio se obtuvieron de Millipore Corp., USA. Según la recomendación del

fabricante, la disolución se prefiltró a través de por lo menos un filtro de 100 µm antes de la filtración MF y/o UF. Se usó siempre un filtro de cápsula Opticap™ XL con medio Polygard® CR (Millipore Corp. USA) con un corte de 50 µm. Cada filtro de cápsula se usó un máximo de dos veces. Entre las filtraciones, las cápsulas se trataron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

5 4.2.1 Membrana para microfiltración

Para microfiltraciones, la disolución de proteína se filtró a través de un cartucho Biomax® Pellicon® 2 que tiene un valor de corte de peso molecular (MWCO) de 1000 kDa. El área de filtración era de 0,1 m² y el tipo de tamiz era V. El material de la membrana era polietersulfona. Millipore clasifica los canales de alimentación de la membrana como tipo V, C y A. El tipo V tiene la más abierta geometría del canal de alimentación mientras que el A tiene la más cerrada.

10 4.2.2 Membranas para ultrafiltración

Se ensayaron tres diferentes cartuchos de ultrafiltración en este estudio y se listan en la Tabla 1. Los experimentos preliminares se efectuaron usando un tipo de cartucho malla V de Biomax. El tipo V se seleccionó porque no se sabía nada acerca del posible efecto de obturación o formación de agregados durante la filtración en el caso de esta disolución específica. Los canales de alimentación del cartucho son los más abiertos en los cartuchos de tipo V, lo que da cuenta de por qué no se bloquean tan fácilmente. Los cartuchos de tipo C que tienen un diámetro más estrecho del canal de alimentación se seleccionaron para experimentos adicionales en base a los resultados positivos obtenidos.

Tabla 1. Cartuchos usados para experimentos de ultrafiltración

Marca del filtro	Material del filtro	MWCO kDa	Área de filtración, m ²	Tipo de malla
Biomax	Polietersulfona	10	0,1	V
Biomax	Polietersulfona	10	0,1	C
Ultracel	Celulosa regenerada	10	0,1	C

20 5 Experimentos

Los experimentos se llevaron a cabo en Kajaani University Consortium's Laboratory of Biotechnology en cuatro fases. En la primera fase, se efectuaron estudios de viabilidad para descubrir cómo se comporta globalmente el sistema. La segunda fase de los experimentos incluía las etapas de optimización de flujo y presión transmembrana (TMP) para los cartuchos tanto de 1000 kDa como de 10 kDa (tipo V).

La tercera fase empleaba un plan de diseño experimental creado usando el programa de modelado y diseño "MODDE". El objetivo era determinar los factores que tienen el efecto más fuerte en la ultrafiltración, incluyendo el tipo de la membrana. Los cartuchos estudiados en este punto fueron Biomax y Ultracel de tipo C. En la fase final, ambos cartuchos de 10 kDa de tipo C (Biomax y Ultracel) se sometieron a ensayos de optimización de flujo versus TMP.

Antes de cada filtración los cartuchos se lavaron con agua de ósmosis inversa (RO) de modo que por lo menos se recogieron cinco litros del lado del filtrado. Después de eso, el sistema se equilibró haciendo circular un litro de GuHCl pura cuatro molar (4 M) en el sistema durante diez minutos. El sistema se vació a continuación antes de que el extracto de proteína se vertiera en el recipiente de alimentación. Después de cada filtración el circuito de fracción retenida se vació y lavó con un volumen conocido de GuHCl 4 M antes de limpiar.

35 5.1 Fase uno: ensayos de viabilidad

Se estudió la filtrabilidad del extracto de proteína prefiltrado a través del cartucho de 1000 kDa primero filtrando un lote de 45 litros. Se usó una velocidad de la bomba de 5 Hz. El intervalo de TMP permaneció entre 0,65 y 0,73 bar. Las muestras para el análisis de proteína se tomaron siempre de corrientes de filtrado y fracción retenida cuando se habían recogido 4 litros de filtrado. Cuando se recogieron 44 litros de filtrado, se añadió un litro de GuHCl 4 M al recipiente de alimentación. Su usó este denominado desplazamiento para incrementar el rendimiento de proteína en el filtrado. La filtración continuó hasta que se había recogido más de un litro de filtrado. Se tomaron muestras también al final de desplazamiento. El factor de concentración volumétrica (VCF) de la filtración era 45.

El filtrado de la filtración de 1000 kDa precedente se sometió a ultrafiltración. Se efectuaron dos filtraciones separadas usando volúmenes de lote de 22 l y 23 l. Los VCFs aplicados eran 10,5 y 8,5 respectivamente. Se obtuvo una TMP de 0,75-0,78 usando la velocidad de la bomba de 12 Hz en ambos experimentos. Se tomaron muestras para análisis de la misma manera que se habían aplicado después de la microfiltración.

5.2 Fase dos: Optimización de flujo y TMP para cartuchos del tipo V

5.2.1 Optimización de flujo y TMP para cartucho de microfiltración

Para membranas abiertas, como aquellas comúnmente usadas en microfiltración, el flujo crítico se determina en el modo de reciclado total. En este estudio, 5 litros de extracto de proteína prefiltrado se hicieron circular en el sistema usando cuatro diferentes caudales de alimentación. Se usaron velocidades de la bomba de 5, 7,5, 10 y 12,5 Hz para crear caudales de alimentación de alrededor de 1,15, 1,66, 2,15 y 2,75 l/min, respectivamente. Debido a que el flujo de filtrado era tan insignificante al inicio del experimento, estos valores también corresponden a los caudales transversales iniciales. La expresión caudal transversal se refiere al caudal de la fracción retenida y se usa comúnmente en el contexto de las curvas de flujo versus TMP. Inicialmente la válvula de estrangulamiento del filtrado estaba cerrada. A un caudal dado se incrementó el flujo ligeramente abriendo apenas la válvula. El sistema se dejó estabilizar durante 10-20 minutos. Se registraron el flujo y la TMP a intervalos de 5 minutos. Este procedimiento continuó hasta que la válvula estaba completamente abierta o la TMP ya no era lineal con el flujo. En el último caso se ha alcanzado el valor crítico para el flujo (flujo de filtrado).

5.2.2 Optimización de flujo y TMP para el cartucho de ultrafiltración de tipo V

La optimización de los parámetros para cartucho de ultrafiltración es diferente de para la microfiltración. En este estudio se determinaron las curvas de flujo versus TMP para extracto microfiltrado a dos concentraciones (VCF 1 y 10) usando un par de diferentes caudales de alimentación.

En el caso de VCF 1 los caudales de alimentación (y los caudales transversales iniciales) fueron 1,15, 1,66, 2,15 y 2,75 l/min. Las velocidades de la bomba correspondientes fueron 5, 7,5, 10 y 12,5 Hz. En el caso de VCF 10 los caudales de alimentación usados fueron 0,66 y 2,75 l/min, respectivamente.

Los experimentos se iniciaron haciendo circular 10 litros de extracto de proteína en el modo de reciclado total. En cada caudal se elevó la TMP progresivamente a intervalos de 5-10 minutos cerrando la válvula de estrangulamiento de la fracción retenida. Se registraron los cambios en el flujo. Si la pendiente de la curva de flujo versus TMP comenzó a disminuir, se había alcanzado el punto óptimo de TMP. Después de que el procedimiento se llevó a cabo con los cuatro caudales transversales, el extracto de proteína se concentró a un VCF 10. El procedimiento descrito anteriormente se repitió a continuación.

5.3 Fase tres: Diseño experimental usando MODDE

Se creó un diseño sistemático de experimentos usando el software de modelado y diseño MODDE (MODDE 8, Umetrics AB, Umea, Suecia). Todos los factores implicados en el procedimiento de ultrafiltración se resumieron primero en el diagrama de Ishikawa, también conocido como el diagrama de espina de pescado. Los cuatro factores seleccionados para los experimentos se listan en la Tabla 2. Los factores pueden ser cualitativos o cuantitativos. El valor de un factor cuantitativo se puede ajustar. El tipo de membrana es un ejemplo típico de un factor cualitativo. Las respuestas medidas durante los ensayos fueron la duración de cada filtración y el rendimiento (concentración de proteína total en la disolución concentrada).

Tabla 2. Factores seleccionados para los experimentos MODDE y sus propiedades.

Factor	Cuantitativo/cualitativo	Controlable	Intervalo
Velocidad de la bomba (caudal de alimentación)	Cuantitativo	Si	3-6 Hz
Temperatura	Cuantitativo	Si	15-30°C
Estrangulación de la fracción retenida	Cuantitativo	Si	20-80%
Membrana	Cualitativo	Si	A o B

La organización total de los ensayos se presenta en la Tabla 3. Hubo en total 11 experimentos de ensayo. Durante el estudio, la membrana Biomax C se denominó membrana "A" y la membrana Ultracel C membrana "B". El intervalo de "estrangulación de la fracción retenida" (20-80%) se definió como el porcentaje de cierre de la válvula de estrangulamiento de la fracción retenida. Las velocidades de la bomba de 3, 4,5 y 6 Hz crearon caudales de alimentación de 730, 1.035 y 1.350 ml/min, respectivamente. La temperatura entre 15 y 30°C fue el cuarto factor seleccionado.

Fueron ignorados algunos factores, a saber, el volumen, la concentración inicial, diferencias por lotes y el estrangulamiento de filtrado. Se ha encontrado que las diferencias entre lotes son insustanciales (resultados no mostrados). El volumen y la concentración del extracto de proteína serán constantes en el procedimiento de filtración final. El uso de estrangulamiento del filtrado solo retrasaría el procedimiento, de modo que no había razón para estudiar su impacto. El operador y el equipo, a excepción de las membranas, se consideró que tiene un efecto

insignificante sobre el resultado de la filtración.

Se creó un conjunto de 11 filtraciones en orden aleatorio usando el software y seleccionado "Screening" como objetivo y "Fractional Factorial" lineal para el modelo de diseño. La resolución era IV. A continuación se ejecutó el diseño usando un volumen inicial de tres litros en cada filtración. A continuación se aplicó el VCF de 10, que detuvo la filtración cuando se recogieron 2,7 litros de filtrado. El tiempo requerido para la filtración se registró (con una precisión de 1 minuto) y se tomaron muestras del filtrado y concentrado para la determinación de la concentración de proteína total. El perfil de proteínas se analizó también para algunos de los experimentos (véase el capítulo 5.6.2). Los resultados fueron evaluados con MODDE usando métodos de mínimos cuadrados parciales (PLS). Los experimentos de filtración números 9, 10 y 11 fueron los denominados experimentos de punto central. El procedimiento se repitió tres veces usando los mismos puntos de ajuste de los factores. En los experimentos de punto central los valores de los factores están siempre en el medio del intervalo de cada factor. Estos experimentos repetidos se usan para evaluar la variabilidad de los ensayos, incluyendo los métodos analíticos.

Tabla 3. Diseño de los ensayos de filtración generados usando el software MODDE

Exp. No.	Nombre del Exp.	Orden del exp.	Incl/excl.	Hz de la bomba	% válvula de estrangulamiento de fracción retenida	Temp °C	Membrana
1	N1	5	incl	3,0	20,0	15	A
2	N2	1	incl	6,0	20,0	15	B
3	N3	2	incl	3,0	80,0	15	B
4	N4	6	incl	6,0	80,0	15	A
5	N5	3	incl	3,0	20,0	30	B
6	N6	7	incl	6,0	20,0	30	A
7	N7	8	incl	3,0	80,0	30	A
8	N8	4	incl	6,0	80,0	30	B
9	N9	9	incl	4,5	50,0	22,5	A
10	N10	11	incl	4,5	50,0	22,5	A
11	M11	10	incl	4,5	50,0	22,5	A

5.4 Fase cuatro: Optimización de flujo y TMP para cartuchos de ultrafiltración de tipo C

En comparación con los cartuchos de tipo V los canales de alimentación en los cartuchos de tipo C son más cerrados. De este modo, se requiere un menor caudal de alimentación para crear valores de TMP iguales a los cartuchos de tipo V. En este estudio, las curvas de flujo versus TMP se determinaron a dos concentraciones (VCF 1 y 5). Los valores de los caudales de alimentación iniciales para ambos cartuchos y los VCFs se presentan en la Tabla 4. El cartucho Biomax se denomina membrana A y el cartucho Ultracel membrana B. Los experimentos se iniciaron con 5 litros de extracto de proteína en el modo de reciclado total. De otro modo, el procedimiento es el mismo que se describe en el capítulo 5.2.3. Un punto adicional era la verificación de la denominada histéresis: Cuando se llegó al más alto punto de TMP, se bajó gradualmente la TMP. Si el flujo retornó a su valor inicial la membrana no se había obturado.

Tabla 4. Características seleccionadas para la optimización de flujo versus TMP de cartuchos de 10 kDa de tipo C

	Bomba/caudal de alimentación (Hz/ l/min)			
Membrana/VCF	3/0,730	4/0,945	5/1,125	6/1,350
A/VCF 1		X	X	X
A/VCF 5		x		x
A/VCF 1	x	x	x	
A/VCF 5		x	x	

5.5 Protocolo de limpieza de la membrana

Después de cada ciclo de filtración las membranas se sometieron a limpieza. El volumen de la disolución de limpieza fue 1 l (10 l/m² de área de la membrana). La disolución se hizo circular en el sistema y se ajustó la temperatura vía un intercambiador de calor. Se usó un intervalo de temperatura de alrededor de 35 a 45°C. Se usó hidróxido de sodio (NaOH) como agente de limpieza en concentración de 0,1 a 0,4 M. El intervalo de tiempo de contacto era de 30, 45 o 60 minutos, dependiendo del caso. El sistema se lavó con agua de RO de modo que se recogieron un total de 5 a 7 litros de la salida de filtrado. Después de esto, se midió el valor para la permeabilidad de agua normalizada (NWP) como se describe en el capítulo 5.6.4. Si es necesario, se repitió la limpieza, posiblemente en condiciones más severas.

5.6 Medidas efectuadas

Las muestras para la concentración de proteína y los análisis SDS-PAGE se efectuaron en una compañía finlandesa, Oulu. Las otras medidas se efectuaron en el Kajaani University Consortium's Laboratory of Biotechnology. Se debe advertir que no se realizaron necesariamente todas las medidas para cada muestra.

5.6.1 Concentración de proteína

Se analizaron las muestras de los ensayos de viabilidad (fase uno) para ver su concentración de proteínas usando el dispositivo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.). El análisis se basa en espectrometría UV. La determinación de la concentración de proteína total de todas las otras muestras se realizó usando el ensayo colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). El reactivo colorante usado se adquirió de Bio-Rad Laboratories, EE.UU. y seroalbúmina bovina (BSA) de MP Biomedicals, EE.UU. La BSA se usó como el material proteínico de referencia para preparar las curvas estándar de calibración de concentración de proteína. Sin embargo, los resultados variaron dependiendo del método de ensayo usado. Por eso los resultados obtenidos de los ensayos preliminares usando NanoDrop se usaron sólo para propósitos de selección.

5.6.2 Análisis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es un método común para la separación de proteínas según su tamaño. El perfil de proteínas se puede visualizar sobre un gel usando un colorante específico de la proteína. En procedimientos de filtración la SDS-PAGE proporciona una excelente información de cómo ha tenido éxito la filtración. Por ejemplo, se puede ver claramente si el filtro está funcionando de acuerdo a su valor nominal de corte de peso molecular. En este estudio, se realizó SDS-PAGE usando el dispositivo Bio-Rad Mini Protean II según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, USA). El método se basa en el sistema descrito por Laemmli (1970).

Debido a que el GuHCl interrumpe el análisis de SDS-PAGE, las muestras de los experimentos de filtración primero tuvieron que ser dializadas contra agua. Durante la diálisis precipitaron la mayoría de las proteínas en el extracto. Por eso el precipitado y el sobrenadante se liofilizaron juntos después de la diálisis. Una porción del material proteínico liofilizado se pesó y se disolvió en urea 6 M. La concentración de proteínas se midió usando el método de Bradford (1976). Las muestras para SDS-PAGE se prepararon a continuación según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, USA). En el caso del filtrado de filtración la cantidad de material liofilizado era a veces tan minúscula que el pesaje no era posible. En su lugar, se disolvió al azar en urea 6 M y a continuación se analizó la concentración de proteína.

Se cargaron típicamente quince microgramos de proteína en pocillos de geles. En el caso de muestras de filtrado la cantidad podría ser menor. Se usó Precision Plus Dual Color Protein Standard (BioRad Laboratories, USA) como un estándar de peso molecular. La electroforesis se realizó usando un voltaje constante de 200 V y el tiempo promedio del experimento era de alrededor de 50 minutos.

5.6.3 Caudales y presión transmembrana

El sistema Millipore ProScale estaba equipado con un caudalímetro digital. El caudal de la fracción retenida, o caudal transversal se midió usando un cronómetro y un cilindro de vidrio graduado de uno o dos litros. La unidad del caudal de filtrado era kg/min, pero se midió que era bastante cercano a l/min, también cuando se usan disoluciones 4 M de hidrocloreuro de guanidina. El caudal de alimentación podría calcularse sumando los caudales de la fracción retenida y filtrado. La presión transmembrana (TMP) se muestra directamente en el sistema ProScale pero también se puede calcular usando la ecuación (1):

$$TMP \text{ (bar)} = \left[\frac{P_{\text{alimentación}} + P_{\text{fra. ret}}}{2} \right] - P_{\text{filtrado}} \quad (1)$$

en la que

$P_{\text{alimentación}}$ es la presión de alimentación (bar),

$P_{\text{fra. ret}}$ es la presión del fracción retenida (bar) y

P_{filtrado} es la presión de filtrado (bar).

5.6.4 Permeabilidad del agua normalizada

5 Cuando se usa un filtro por primera vez, se debe determinar su permeabilidad del agua normalizada inicial. Será el valor con el que se comparan las medidas posteriores. Es aconsejable usar siempre los mismos parámetros del procedimiento para determinar la NWP. La ecuación (2) se usa para el cálculo de la NWP:

$$NWP = \frac{Q_{\text{filtrado}} \cdot F}{TMP \cdot A} \quad (2)$$

en la que

Q_{filtrado} es el caudal de filtrado (l/h),

A es el área total de filtro (m^2),

10 TMP es la presión transmembrana (bar) y

F es el factor de corrección de la temperatura del Apéndice 1.

La medida de la NWP siempre se realizó después de la limpieza y antes de las filtraciones. Medir la NWP es la más directa demostración de la eficiencia de la limpieza. Cuanto más cerca se pueda restaurar a su valor original, mejor es la eficacia de la limpieza.

15 5.6.5. Integridad del filtro

Para confirmar la integridad de los filtros se debe realizar regularmente un ensayo de flujo de aire. El módulo de filtro se une al sistema Millipore BenchScale y el ensayo se realizó según el procedimiento proporcionado por el fabricante (Millipore Corporation 1998). Brevemente, el módulo de filtro limpio y humedecido se unió a un suministro de gas (aire o nitrógeno) regulado. Se hizo pasar gas desde el lado de la alimentación del filtro a una presión específica de la membrana. Se conectó un tubo de plástico a una salida de filtrado. El otro extremo del tubo se condujo a un cilindro de vidrio graduado invertido lleno de agua. Este cilindro se colocó en un recipiente mayor lleno de agua. El caudal de aire se podría determinar a continuación midiendo el volumen de aire desplazado dentro del cilindro de gas en un tiempo dado. Cada tipo y tamaño de membrana tiene su propio límite máximo de flujo de aire para cumplir los requisitos de integridad.

25 5.6.6 Obturación de la membrana

Típicamente, el grado de obturación de la membrana se puede calcular usando la siguiente Ecuación (3):

$$\% \text{ de obturación} = \frac{\text{Flujo}_{\text{inicial}} - \text{Flujo}_{\text{final}}}{\text{Flujo}_{\text{inicial}}} \cdot 100\% \quad (3)$$

en la que

Flujo_{inicial} es el flujo de filtrado en el inicio de la filtración y

30 Flujo_{final} es el flujo de filtrado el final de la filtración.

Un modo de calcular la obturación de la membrana es comparar los caudales de agua antes y después de la filtración antes de limpiar. En este estudio muchas de las proteínas en el extracto precipitan cuando entran en contacto con agua. De este modo, los porcentajes de obturación calculados no necesariamente indican la obturación que ocurrió durante la filtración. La obturación total se puede monitorizar también durante la filtración para observar la disminución del flujo. El efecto de obturación se puede calcular de la disminución del flujo durante este periodo usando la Ecuación (3).

5.6.7 Balance de masa

Para entender como se distribuyen las proteínas en el procedimiento, se realizan cálculos de balance de masa. Una ecuación útil para este propósito es la Ecuación (4):

$$40 \quad \% \text{ Balance de masa} = \left[\frac{(V_{\text{ret}} C_{\text{ret}}) + (V_{\text{perm}} C_{\text{perm}}) + (V_{\text{dia}} C_{\text{dia}})}{V_{\text{inicial}} C_{\text{inicial}}} \right] \cdot 100\% \quad (4)$$

en la que

V_{ret} es el volumen de la fracción retenida (l),

C_{ret} es la concentración de proteína de la fracción retenida (mg/ml o g/l),

V_{perm} es el volumen del filtrado (l),

C_{perm} es la concentración del filtrado (mg/ml o g/l),

V_{lav} es el volumen de la disolución usado para lavar el circuito (l),

C_{lav} es la concentración de proteína en la disolución usada para lavar el circuito (mg/ml o g/l),

5 $V_{inicial}$ es el volumen de la disolución inicial de alimentación (l) y

$C_{inicial}$ es la concentración de proteína de la disolución de alimentación inicial (mg/ml o g/l).

Debido a muchas razones, el porcentaje del balance de masa raramente es 100. Alguna porción de proteínas estará atascada dentro de la membrana. Siempre hay algún volumen de retención en el cartucho y equipo. Además, los métodos de determinación no son precisos.

10 6 Resultados

6.1 Integridades de los filtros

La integridad de todos los filtros de membrana analizados estaba en el nivel permitido. Los resultados de los ensayos no se muestran aquí.

6.2 Viabilidad de la microfiltración con cartucho

15 La viabilidad del filtro de cartucho de polietersulfona de 1000 kDa se estudió usando un volumen de lote de 45 litros y el VCF final de 45. La Figura 1 representa como evolucionó el flujo de filtrado en el curso de la filtración. Se puede ver claramente que el flujo permanece entre 36 y 30 LMH la mayor parte del tiempo. La caída al final es probablemente debida a la incrementada polarización de la concentración. Hubo un pronunciado aumento de la concentración de proteína total en la corriente de la fracción retenida al final de la filtración (Figura 2). La
20 concentración en el filtrado permanecía casi constante durante la filtración.

6.2.1 Balance de masa en microfiltración

Se determinó el balance de masa de la microfiltración. Los resultados se resumen en la Tabla 5. El porcentaje del balance de masa calculado usando la Ecuación (4) era 94, lo que significa que el 6% de proteína se había perdido en cierto modo después de la filtración. Siempre hay una cierta pérdida debido al volumen de retención del cartucho
25 de filtro, conducciones y bomba. Alguna de las pérdidas probablemente se origina en la obturación de la membrana. El volumen de retención para cartuchos usados en este trabajo está en el intervalo de 30 ml. Después de la etapa de lavado la cantidad de proteína en el volumen de retención se considera por lo tanto que es despreciable.

Tabla 5. Cálculos del balance de masa para filtración de 1000 kDa

Fracción	Volumen total (l)	$C_{proteína}$ (mg/ml)	Proteína total (g)	Valor del porcentaje (%)
Alimentación	45	0,625	28,125	100
Filtrado	45	0,513	23,085	82
Concentrado	0,5	3,945	1,973	7
Lavado	0,4	3,680	1,472	5
% de balance de masa				94

30 6.3 Viabilidad de la ultrafiltración de cartucho

Lotes microfiltrados de 22 y 23 litros se ultrafiltraron usando un filtro de 10 kDa de tipo V. Tardó 5 horas en llegar a VCFs de 10,5 y 8,5, respectivamente. Las dos filtraciones se comportaron en general bastante similarmente lo que se puede ver de las velocidades de flujo (Figuras 3A y 3B). En ambos casos la caída de flujo durante los 10 primeros minutos era 6-7%. Esto es provocado usualmente por la polarización de la concentración y posiblemente por la
35 obturación. Cuando se había llegado a los VCFs finales los flujos eran el 72 y 73% (39 y 38,4 LMH) de los valores iniciales de 54 y 52,8 LMH, respectivamente.

6.3.1 Balances de masa en ultrafiltraciones

Las dos ultrafiltraciones dieron balances de masa muy próximos entre sí. Los porcentajes de pérdida de balance de masa eran 3 y 5%. La mayor parte de la proteína se podría encontrar en el concentrado (la fracción retenida) como

se ve en la Tabla 6. Una diferencia chocante era la concentración de proteína ($C_{\text{proteína}}$) en las alimentaciones. Las concentraciones medidas eran 0,47 y 0,555 mg/ml aunque el material era el mismo. Esto podría ser debido a variaciones en el método de análisis.

Tabla 6. Cálculos del balance de masa para dos filtraciones de 10 kDa (cartucho de tipo V)

Fracción	Volumen total (l)	$C_{\text{proteína}}$ (mg/ml)	Proteína total (g)	Valor del porcentaje (%)
Alimentación	22	0,47	10,43	100
	23	0,555	12,77	100
Filtrado	19,2	0,05	0,96	9
	20	0,05	1,0	8
Concentrado	2,1	4,1	8,61	83
	2,75	3,88	10,67	84
Lavado	0,4	1,535	0,61	6
	0,4	1,225	0,49	4
Balance de masa total				98
				95

6.3.2 Análisis SDS-PAGE del filtrado en ultrafiltración

El perfil proteínico del filtrado muestra excelentemente lo bien que la membrana satisface sus especificaciones. El ensayo de integridad usualmente revela si la membrana ha perdido su selectividad pero el análisis SDS-PAGE muestra también los detalles para el cartucho intacto. La Figura 4 muestra el perfil proteínico del filtrado de la ultrafiltración de 23 litros. Se puede ver claramente que no hay proteínas mayores de alrededor de 13 kDa. Este es un muy buen resultado para un cartucho de 10 kDa de corte.

6.4 Optimización de flujo y TMP para cartucho de microfiltración

La optimización del rendimiento de flujo de microfiltración se describe en el capítulo 5.2.2. El fin es determinar las condiciones en las que se consigue el más alto flujo estable. Se usaron cuatro caudales transversales diferentes. Los resultados se presentan en las Figuras 4 y 5.

Una característica común de los cuatro casos era la caída de flujo en el inicio de los experimentos. Esto es probablemente debido al efecto de obturación o polarización de la concentración. Después de los primeros 15 minutos el flujo parecía estabilizarse. De la Figura 5 no se puede concluir que se consiguiera el flujo crítico usando los caudales transversales de 1,15 o 1,66 l/min. Sin embargo, alrededor del punto de tiempo de 70 minutos hubo una disminución de flujo a TMP constante en ambos casos. Cuando se abre totalmente la válvula de filtrado en la siguiente fase, los flujos parecían ser estables.

Cuando se usan caudales transversales de 2,15 y 2,75 l/min (Figura 6) sacar conclusiones es más complicado. Hay una ligera disminución del flujo durante los primeros 15 minutos de cada fase. Sin embargo, se podría ver una más significativa disminución durante la última fase en ambos casos. Se podría por lo tanto definir que los flujos críticos son de alrededor de 60-66 LMH cuando el caudal transversal inicial es 2,15 l/min y alrededor de 72-78 LMH cuando el caudal transversal es 2,75 l/min.

6.5 Optimización de flujo y TMP para cartucho de ultrafiltración de tipo V

Como se describe en el capítulo 5.2.2, se estudió el flujo versus TMP usando cuatro diferentes caudales transversales y dos valores de VCF (1 y 10). Las curvas obtenidas se presentan en las Figuras 7 (VCF 1) y 8 (VCF 10).

Cuando el VCF era 1, la pendiente de la curva comenzaba a descender solo a caudales transversales de 1,15 y 1,66 l/min (Figuras 7A y B). Esto sucedió en ambos casos a una TMP de alrededor de 2,5 bar y los flujos óptimos correspondientes eran de alrededor de 84 y 96 LMH, respectivamente. A más alta presión el lavado de la superficie de la membrana puede no ser suficiente a estos dos más bajos caudales transversales. A más altos caudales transversales (2,15 l/min y 2,75 l/min) el fenómeno no se observó (Figuras 7C y D). La TMP se podría haber elevado más pero la presión de alimentación era ya casi 3 bar cuando la TMP era 2,36 bar y 2,27 bar, respectivamente. Los flujos a estas presiones era 105 y 108 LMH y están en el intervalo lineal.

Usando una concentración más alta de la disolución de proteína (VCF 10), el descenso de la pendiente se veía más

claramente. Como se muestra en la Figura 8A, la TMP óptima es 1,8 bar dando el flujo de 60 LMH a el caudal transversal de 1,66 l/min. Cuando el caudal transversal era 2,75 l/min los valores comparables son 2 bar para TMP y alrededor de 78 LMH para el flujo (Figura 8B). Todos los resultados, incluyendo aquellos para el VCF 1 se resumen en la Tabla 7.

5 Tabla 7. TMPs óptimas y valores correspondientes de flujo para diferentes caudales transversales iniciales y VCFs

VCF	Caudal transversal (l/min)	TMP óptima (bar)	Flujo (LMH)
1	1,15	2,5	85
1	1,66	2,65	99
1	2,15	>2,36	>105
1	2,75	>2,27	>108
10	1,66	1,8	60
10	2,75	2	78

6.6 Diseño experimental usando MODDE

10 Se llevaron a cabo una serie de experimentos diseñados usando el software MODDE. Consistían en 11 ultrafiltraciones con diferentes composiciones de parámetros. Las respuestas medidas fueron la duración de la concentración de 3 litros de extracto de proteína a VCF 10 y la concentración de proteína total. Los resultados directos se presentan en la Tabla 8. Los valores de TMP variaban dependiendo de la velocidad de la bomba y la obstrucción de la fracción retenida. El intervalo era 0,5-1,45 bar en el caso de la membrana A y 0,65-1,85 en el caso de la membrana B.

15 Tabla 8. Un resumen de parámetros y respuestas obtenidas de experimentos de ultrafiltración diseñados usando el software MODDE

Exp. No.	Nombre del Exp.	Orden del exp.	Incl/excl	Bomba Hz	% estrangulamiento de la fracción retenida	Temp. °C	Membrana	Tiempo min	Conc. mg/ml
1	N1	5	Incl.	3,0	20,0	15	A	51	2,02
2	N2	1	Incl.	6,0	20,0	15	B	18	2,08
3	N3	2	Incl.	3,0	80,0	15	B	30	2,2
4	N4	6	Incl.	6,0	80,0	15	A	20	2,22
5	N5	3	Incl.	3,0	20,0	30	B	31	2,28
6	N6	7	Incl.	6,0	20,0	30	A	25	2,24
7	N7	8	Incl.	3,0	80,0	30	A	40	2,4
8	N8	4	Incl.	6,0	80,0	30	B	13	1,9
9	N9	9	Incl.	4,5	50,0	22,5	A	33	2,18
10	N10	11	Incl.	4,5	50,0	22,5	A	33	2,2
11	N11	10	Incl.	4,5	50,0	22,5	A	33	2,02

6.7.1 Ajuste del modelo

20 Los valores de las respuestas (tiempo y concentración de proteína, o rendimiento) se insertaron en MODDE. El modelo se ajustó usando el método de mínimos cuadrados parciales (PLS) y se sometió al análisis de la varianza (ANOVA). La Figura 9 representa el gráfico denominado Resumen del Ajuste. Para cada respuesta ajustada hay cuatro barras en el gráfico. Según el manual del software MODDE, los valores para R^2 y Q^2 proporcionan el mejor resumen del modelo. R^2 describe lo bien que el modelo de regresión se puede hacer que ajuste los datos y se denomina "bondad del ajuste". Q^2 se refiere a la "bondad de la predicción" y describe el poder predictivo del modelo. Generalmente R^2 y Q^2 deben ser altos y no estar separados más de 0,2-0,3. La barra "MV" en la Figura 20 describe la validez del modelo. Si el valor está por debajo de 0,25, el error del modelo es notablemente mayor que la

reproducibilidad mostrada como barra "RE". (Umetrics AB 2003). Para el valor Tiempo, todos los parámetros evaluativos son buenos excepto la validez del modelo (Figura 9). La validez del modelo no se puede calcular porque los experimentos repetidos de punto central dieron exactamente el mismo resultado (100% de reproducibilidad). Para el rendimiento (concentración de proteína) la bondad del modelo y la predicción son bajas o cero, lo que significa que el sistema de filtración es muy robusto con respecto al rendimiento: Los cambios dentro del intervalo de parámetros seleccionados entonces no tienen una influencia sobre el rendimiento.

La tabla de ANOVA sobre el rendimiento (Tabla 9) muestra que la falta de ajuste no es significativa con un nivel de confianza del 95% dado que $p > 0,05$. Como se ve también en la Figura 9, no hay error del modelo con respecto al rendimiento. El valor p de la regresión es 0,730, que está muy por encima del valor crítico 0,05. La regresión por tanto no es significativa con un nivel de confianza del 95%, y el rendimiento no se puede predecir usando el modelo. Para el valor del tiempo, la tabla de ANOVA (Tabla 10) parece diferente. El valor p para la falta de ajuste (error del modelo) no se pudo determinar. Todos los experimentos de punto central específicamente dieron como resultado los mismos valores de tiempo. Por lo tanto, no hay un error real en el modelo. Indicando el $p=0,000$ para la regresión muy buen modelo con respecto al tiempo de filtración.

Tabla 9. Tabla ANOVA para el rendimiento. DF es grados de libertad, SS es la suma de cuadrados, MS es la media de los cuadrados y SD es la desviación estándar.

Rendimiento	DS	SS	MS (varianza)	F	p	SD
Total	11	51,434	4,67582			
Constante	1	51,2352	51,2352			
Total corregido	10	0,198757	0,0198757			0,140981
Regresión	4	0,0506643	0,0126661	0,513167	0,730	0,112544
Residual	6	0,148093	0,0246822			0,157106
Falta de ajuste (error del modelo)	4	0,128626	0,0321566	3,30375	0,246	0,179322
Error puro (error de repetición)	2	0,0194667	0,00973334			0,0986577

N=11 $Q^2=0,000$ Cond. no.=1,049

DF=6 $R^2=0,255$ Y-miss=0

Comp.=2 $R^2 \text{ Adj}=-0,242$ RSD=0,1571

Tabla 10. Tabla ANOVA para el tiempo. DF es grados de libertad, SS es la suma de cuadrados, MS es la media de los cuadrados y SD es la desviación estándar.

Tiempo	DS	SS	MS (varianza)	F	p	SD
Total	11	10847	986,091			
Constante	1	9720,82	9720,82			
Total corregido	10	1126,18	112,618			10,6122
Regresión	4	1079,47	269,867	34,6618	0,000	16,4276
Residual	6	46,7143	7,78571			2,79029
Falta de ajuste (error del modelo)	4	46,7143	11,6786	-	-	3,41739
Error puro (error de repetición)	2	0	0			-

N=11 $Q^2=0,738$ Cond. no.=1,049

DF=6 $R^2=0,959$ Y-miss=0

Comp.=2 $R^2 \text{ Adj}=-0,931$ RSD=2,79

6.7.2 Evaluación de los resultados

El tiempo era la única respuesta que se podría afectar. La Figura 10 muestra como influía cada parámetro en el tiempo de ultrafiltración. Se puede ver claramente que la velocidad de la bomba (es decir, caudal de alimentación)

tiene el mayor efecto en la duración de la filtración. Una velocidad más alta da como resultado una filtración más rápida. El estrangulamiento de la corriente de la fracción retenida tiene una influencia minúscula. La temperatura no parece jugar ningún papel dado que su barra de error es incluso mayor que la barra real que describe el efecto. Cuando se comparan membranas, parece obvio que la membrana B es una mejor elección. Seleccionar la membrana B proporciona alrededor de 5 minutos de tiempo de filtración más corto comparado con el tiempo medio. Para la membrana A, el tiempo correspondiente es alrededor de 5 minutos más largo.

La calidad de la filtración es otro factor importante. Se estudió tomando muestras de los filtrados y midiendo su concentración de proteína. En todas las muestras la concentración estaba por debajo de 0,05 mg/ml excepto en el filtrado del experimento 4 en el que la concentración era 0,06 mg/ml. El perfil proteínico de los cuatro filtrados se estudió usando análisis SDS-PAGE. Los perfiles se muestran en la Figura 11. Los filtrados de los experimentos 1 y 4 (líneas 2 y 3) se obtuvieron por ultrafiltraciones usando membrana B y los filtrados de los experimentos 7 y 10 (líneas 4 y 5) usando membrana A. No hay proteínas mayores de 13 kDa visibles en ninguna de las muestras. Esto significa que en todas las filtraciones estudiadas aquí la membrana funcionaba según su valor de corte teórico. En el caso del experimento 1, apenas se ven proteínas.

6.8 Optimización de flujo versus TMP para cartuchos de ultrafiltración de tipo C

Los filtros de tipo C habían demostrado ser una buena opción para la ultrafiltración del extracto de proteína ósea. Proporcionan una mejor turbulencia y menos resistencia de cizalladura que los filtros de tipo V que tienen canales de alimentación más abiertos. La cizalladura es menor con filtros de tipo C debido a que se obtiene la misma TMP que para el filtro de tipo V con un menor caudal de alimentación. La optimización de flujo versus TMP se estudió según el plan mostrado en la Tabla 4. En el caso del cartucho de filtro Biomax los resultados se presentan en la Figura 12 para VCF 1 y en la Figura 13 para VCF 5. Para el cartucho de filtro Ultracel las correspondientes figuras son la Figura 14 y la Figura 15. En este estudio la concentración de VCF de 1 a VCF de 5 no se realizó usando los más altos valores posibles. Los balances de masa se determinaron después de los experimentos de optimización.

6.8.1 Filtro Biomax

En el caso de VCF 1 se observó la única evidencia clara de un flujo decreciente a un caudal transversal inicial de 0.945 l/min (Figura 12A). Este y todos los demás valores, incluyendo la comprobación de la histéresis se resumen en la Tabla 11. A TMP 2,3 bar el flujo era de alrededor de 108 LMH. A caudales horizontales más altos no se observó disminución del flujo a TMP alrededor de 2,8 bar. No se ensayaron valores más altos porque la presión de alimentación ya estaba en 3,6 bar debido al estrangulamiento de la fracción retenida. De este modo, por lo menos se puede conseguir con seguridad un flujo de 138 LMH a un caudal transversal de 1,125 l/min y 132 LMH a 1.350 l/min, respectivamente.

Cuando se ensayó una concentración más alta (VCF 5) del extracto de proteína a un caudal transversal inicial de 0.945 l/min hubo una ligera disminución de flujo a valores altos de TMP (Figura 13). Esto puede indicar que el punto de flujo crítico estaba cerca. De nuevo, el experimento se detuvo debido a la alta presión de alimentación. Al caudal transversal más alto (1,350 l/min) se observó el punto rodilla cuando TMP era 2,5 bar con el flujo 108 LMH.

6.8.2 Filtro Ultracel

Los filtros Ultracel y Biomax difieren en material de la membrana. Esto provoca diferentes características de flujo. Cómo afecta esto a los eventos de filtración es específico para cada caso. En este estudio usando extracto de proteína ósea, el mismo caudal de 0.945 l/min condujo a la TMP inicial de 1,04 bar y flujo de 57 LMH en el caso de filtro Ultracel en comparación con la TMP inicial de 0,62 bar y el flujo de 30 LMH para el filtro Biomax (Figuras 14B y 12A). En comparación, los valores correspondientes para el filtro Biomax de tipo V, incluso a un caudal transversal superior (1,15 l/min), eran tan pequeños como 0,17 bar y prácticamente flujo cero (Figura 7A). Esto justificaría el uso de cartuchos Ultracel de tipo C.

De las Figuras 14 y 15, se puede concluir que en ninguno de los caudales transversales usados en este estudio se alcanzó el límite superior de TMP y de este modo el flujo máximo. Este era el caso tanto para VCF 1 como para VCF 5. Esto era debido a las limitaciones de la presión de alimentación, que excedía de 3,6 bar. Parece que el filtro Ultracel no se obturaba fácilmente incluso a altas presiones y flujos. La verificación de la histéresis confirmó esto debido a que se consiguió el flujo inicial después de los experimentos. La Tabla 16 resume todos los resultados.

6.8.3 Resumen de los resultados de la optimización de ultrafiltración usando cartuchos de tipo C.

La Tabla 11 resume los resultados obtenidos durante las etapas de optimización para los filtros Biomax de tipo C y cartucho de Ultracel. Se ve claramente que se alcanzó el flujo óptimo en pocos casos. Por lo tanto, ambos tipos de membrana muestran buen rendimiento. Como comparación, el filtro Biomax de tipo V había mostrado un flujo crítico de 84 LMH a un caudal transversal de 1,15 l/min, mientras que el flujo crítico del filtro de tipo C es de más de 138 LMH a un caudal transversal casi igual.

Los resultados de la verificación de histéresis indican que la membrana Biomax se obtura más fácilmente que la membrana Ultracel. Los caudales del filtro Ultracel volvieron a los valores iniciales en todos menos uno de los casos.

Para el filtro Biomax, los caudales promedio fueron el 97% de los valores iniciales, que es un buen resultado. Sin embargo, se deben hacer ensayos adicionales antes de sacar las conclusiones finales.

Tabla 11. Resumen de los resultados de la optimización de flujo versus TMP para ultrafiltros de tipo C

Membrana/VCF	Caudal transversal (l/min)	TMP óptima (bar)	Flujo (LMH)	Histéresis (% del flujo inicial)
Biomax/1	0,945	2,3	108	100
Biomax/1	1,125	>2,95	>138	92
Biomax/1	1,350	>2,8	>129	99
Biomax/5	0,945	>2,85	>114	n.d.
Biomax/5	1,350	2,5	108	96
Ultracel/1	0,730	>2,7	>138	100
Ultracel/1	0,945	>2,6	>144	100
Ultracel/1	1,125	>2,4	>138	100
Ultracel/5	0,945	>2,7	>129	100
Ultracel/5	1,125	>2,4	>117	98

- 5 Los balances de masa de los experimentos mostrados anteriormente se calcularon y se presentaron los resultados en la Tabla 12. En ambos casos no se encontró cantidad detectable de proteína en el filtrado. Las concentraciones de proteína en las disoluciones de lavado y alimentación eran las mismas. La única diferencia se encontró en el concentrado que contenía 87% de la proteína total medida de la alimentación en el caso del filtro Biomax. El valor correspondiente para el filtro Ultracel era 95%. Este alto valor dio como resultado un incremento del 6% en el balance de masa final. Sin embargo, esta única comparación no indica de manera fidedigna que el filtro Ultracel proporciona un rendimiento más alto. Cuando se calculan los rendimientos medios de siete filtraciones usando el filtro Biomax, y cuatro filtraciones usando el filtro Ultracel (Tabla 8), los resultados son 2,18 y 2,12 mg/ml, respectivamente. Como ya se evaluó usando el software MODDE, no hay notables discrepancias respecto al rendimiento.
- 10
- 15 Tabla 12. Cálculos del balance de masa de ultrafiltraciones usando filtros Biomax tipo C y cartucho Ultracel.

Fracción/membrana	Volumen total (l)	C _{proteína} (mg/ml)	Proteína total (g)	Valor del porcentaje (%)
Alimentación/Biomax	5	0,46	2,3	100
Alimentación/Ultracel	5	0,46	2,3	100
Filtrado/Biomax	4	0(<0,05)	0	0
Filtrado/Ultracel	4	0(<0,05)	0	0
Concentrado/Biomax	1	2,01	2,01	87
Concentrado/Ultracel	1	2,01	2,18	95
Lavado/Biomax	0,5	0,5	0,25	11
Lavado/Ultracel	0,5	0,52	0,26	11
Balance de masa /Biomax				98
Balance de masa/Ultracel				106

6.9 Eficiencia de la limpieza de membranas

- 20 El valor de NWP se midió después de la etapa de limpieza, realizada después de cada filtración. Los resultados se resumen aquí. La membrana Biomax parecía obturarse más fácilmente que la membrana Ultracel. La Figura 16 muestra la eficacia de limpieza evaluada por los valores NWP. Se realizaron siete ciclos de filtración usando la membrana Biomax y cuatro usando la membrana Ultracel. Las filtraciones se describen en el capítulo 5.3. Los experimentos de limpieza se llevaron a cabo usando NaOH 0,1 M durante 30 minutos a 37°C. En el caso del filtro Ultracel, la NWP casi volvió a su valor inicial en las cuatro limpiezas. El filtro Biomax mostró menor recuperación

aunque era generalmente por encima de 90%, excepto después de la filtración número 7. Después de los experimentos de optimización de flujo vs. TMP (véase capítulo 6.8) usando estos mismos filtros la recuperación de NWP era 99% para el filtro Ultracel y de 72% para el filtro Biomax cuando se llevó a cabo la limpieza usando NaOH 0,1 M durante 30 minutos a 37°C. Subsecuentemente, cuando se somete el filtro Biomax a limpieza más severa con NaOH 0,2 M durante 60 minutos a 45°C, la NWP volvió al 78% de su valor inicial. Incrementar la concentración de NaOH a 0,3 M y haciéndolo circular durante 45 minutos a 45°C proporcionó un valor de NWP de 80%. Se encontró que se requería este mismo protocolo para restaurar la NWP del cartucho de ultrafiltración Biomax de tipo V y de microfiltración del tipo V a valores por encima de 80% (resultados no mostrados).

6.10 Aumento a escala del procedimiento de filtración

Los filtros de cartucho son linealmente escalables. Por lo tanto, el área de membrana y el caudal de alimentación requeridos en la escala de fabricación final se pueden calcular en base a los resultados obtenidos a pequeña escala. En este estudio los cálculos para aumentar a escala el procedimiento de filtración se realizaron para filtros Ultracel y Biomax de tipo C. Se usaron los valores obtenidos en los experimentos descritos en el capítulo 6.8. El valor de VCF era 5. No se llegó al máximo absoluto para los flujos de filtrado para los filtros Biomax y Ultracel en esos experimentos. Los mayores valores mostrados en la Tabla 11 se usan en los cálculos de aumento a escala. El resumen de los resultados de aumento a escala se muestra en la Tabla 13.

6.10.1 Definiendo el flujo medio de filtrado

El flujo usualmente disminuye durante la filtración. Con propósitos de aumento a escala se necesita un valor medio. El flujo medio de filtrado J_f se puede calcular usando la Ecuación (5):

$$J_f = 0,33 J_{\text{inicial}} + 0,67 J_{\text{final}} \quad (5)$$

en la que

J_{inicial} es el flujo de filtrado inicial (l/m²/h, LMH) y

J_{final} es el flujo de filtrado al final de la filtración (LMH).

Por lo tanto J_{inicial} es el flujo cuando VCF es 1, y J_{final} en este caso es el flujo para VCF de 5. Los valores más altos de flujo de la Tabla 11 para ambos VCFs se usan en los cálculos que usan la Ecuación (5). Cuando VCF es 1, esos valores son 138 LMH para Biomax y 144 LMH para Ultracel. Cuando VCF es 5, los valores correspondientes son 114 LMH y 129 LHM, respectivamente. Substituyendo estos valores en la ecuación (5) da J_f de 121 LHM para Biomax y 134 LHM para Ultracel. Si se desea un sistema muy robusto se puede usar meramente la J_{final} como J_f . Se debe advertir que, desgraciadamente, el flujo crítico para Biomax en el caso de VCF de 5 no se ensayó para el caudal de alimentación de 1,125 l/ml. El uso de este caudal dio los más altos flujos cuando VCF era 1. El valor de 114 LHM obtenido por el caudal de alimentación de 0,945 l/min se usa en los cálculos, lo que puede distorsionar los resultados hasta cierto punto.

6.10.2 Aumento a escala del área de la membrana

El área de membrana requerida para la filtración (concentración) de un cierto volumen de disolución en un tiempo de proceso deseado se puede determinar de la Ecuación (6):

$$A = \frac{(V_{\text{filtrado}}/J_f)}{t} \quad (6)$$

en la que

V_{filtrado} es el volumen del filtrado a procesar (l),

J_f es el flujo (LHM) medio de filtrado determinado a pequeña escala y

t es el tiempo del procedimiento de filtración deseado (h).

Si el volumen del filtrado en la escala de fabricación es 800 l (VCF de 5 para un lote de 1000 l) y el tiempo deseado cuatro horas, el área A de membrana requerida se puede calcular usando la Ecuación (6). Substituyendo los valores de J_f calculados anteriormente dará un área de membrana de 1,65 m² para la membrana de Biomax y 1,49 m² para la membrana de Ultracel. Se recomienda un factor de seguridad adicional de 20% para el área de la membrana (Millipore 2008). Por lo tanto, los valores son 1,98 m² y 1,79 m². En la práctica esto significa el uso de cuatro membranas de 0,5 m², dando un área de la membrana final de 2 m². El área de la membrana aumentada a escala se puede calcular también usando la Ecuación (7). El resultado final es el mismo que el obtenido vía la Ecuación (6).

$$A_{\text{actual}} = A_{\text{sup}} \frac{V_{\text{actual}}}{V_{\text{sup}}} \frac{t_{\text{sup}}}{t_{\text{actual}}} \quad (7)$$

en la que

A_{exp} es el área de la membrana usada en el experimento (m^2),

V_{escal} es el volumen del procedimiento a gran escala (l),

V_{exp} es el volumen usado en el experimento (l),

t_{escal} es el tiempo de filtración deseado en el procedimiento a gran escala (h), y

5 t_{exp} es el tiempo de filtración del experimento (h).

6.10.3 Cálculo del caudal de alimentación en el procedimiento aumentado a escala.

Para el procedimiento de filtración a gran escala el caudal de alimentación también se debe aumentar a escala. Se puede determinar de la Ecuación (8):

$$Q_{alim,escal} = \frac{Q_{alim,exp}}{A_{exp}} \cdot A_{escal} \quad (8)$$

10 en la que

$Q_{alim,exp}$ es el caudal de alimentación usado en el experimento (l/min),

A_{exp} es el área de la membrana usada en el experimento (m^2) y

A_{escal} es el área de la membrana en el procedimiento a gran escala (m^2).

15 Los caudales de alimentación usados en los experimentos a pequeña escala se seleccionan de la Tabla 16. Para el más alto flujo de filtrado usando el filtro Biomax era 1,125 l/min. Para el filtro Ultracel era 0,945 l/min. El área A_{exp} de membrana en los experimentos era 0,1 m^2 . Cuando se insertan los valores de las áreas de membrana aumentadas a escala calculados en el capítulo 6.10.2 y se redondean al próximo más alto valor posible (2 m^2 para ambas membranas) la Ecuación (8) da $Q_{alim,exp}$ de 22,5 l/min para Biomax y 18,9 l/min para Ultracel. En el equipo de filtración a escala final, la capacidad de la bomba se debe dimensionar para cumplir estos requisitos. O si no se tiene
20 que aceptar un incremento del tiempo de procedimiento.

6.10.4 Resumen de los resultados del aumento a escala

Se usó el ejemplo teórico del volumen de lote de 1000 l y VCF de 5 en los cálculos para el procedimiento de aumento a escala. El tiempo del procedimiento a escala total se estableció en 4 horas. Comúnmente se recomienda un periodo de tiempo de 3-4 horas (Millipore 2008). Los resultados se resumen en la Tabla 13. Los precios de la
25 unidad de membrana son precios iniciales de la página web de Millipore Corporation (www.millipore.com). La escalabilidad lineal de los filtros de cartucho permite ajustes rápidos de los cálculos. Por ejemplo, si se dobla el volumen de filtración y se mantiene constante el tiempo de filtración, esto requeriría doblar el área de la membrana. Como se puede ver en la Tabla 13 las diferencias entre las dos membranas no son grandes en este experimento. El filtro Ultracel es un poco más caro que el filtro Biomax.

30 Tabla 13. Resumen de los factores del procedimiento de aumento a escala y coste de la membrana

	Membrana Biomax 10 C	Membrana Ultracel 10 C
Volumen V_{alim} (l)	1000	1000
Volumen $V_{filtrado}$ (l)	800	800
Tiempo de filtración t (h)	4	4
Caudal de alimentación Q_{alim} (l/min)	22,5	18,9
Área de la membrana A (m^2)	2(1,74)	2 (1,67)
Precio de la unidad de membrana (eur)	2227	2498
para filtro de 0,5 m^2		
Número de unidades de membrana necesarias	4	4
Coste total de la membrana (eur)	8908	9992

7 Discusión

Los procedimientos de filtración de materiales biológicos complejos son siempre específicos de cada caso. Cada material tiene su propia composición de proteínas y otros elementos, y sus efectos no se pueden predecir. Además,

la disolución y otras condiciones también afectan el resultado. En este estudio, el extracto de proteína ósea fue sometido a micro- y ultra-filtración y una serie de experimentos se usaron para optimizar el procedimiento tanto como sea posible. No se ha encontrado ningún otro estudio publicado que sea directamente comparable con este estudio. Este tipo de datos de la optimización se recogen típicamente dentro de la industria y por lo tanto no necesariamente están publicados.

Los primeros ensayos de viabilidad mostraron que los filtros de cartucho se pueden aplicar de manera eficiente para micro- y ultra-filtración del extracto de proteína. No se observó ninguna disminución significativa en el flujo de filtrado, ya sea durante las etapas de micro- o ultra-filtración, como se muestra en las Figuras 12 y 14. El factor de concentración volumétrico fue tan alto como 45 para la microfiltración, y 10 para la ultrafiltración. Además, los porcentajes de balance de masa eran satisfactorios: 94% para microfiltración y 95-98% para la ultrafiltración. Si la recuperación total de masa de producto es menor que la masa inicial de producto, es típicamente debido a las pérdidas de adsorción y/o solubilidad durante el proceso (Millipore Corporation 2007). Sin embargo, el método de análisis de proteína usado en este estudio no es absolutamente preciso.

Un objetivo de este estudio era seleccionar el filtro de ultrafiltración apropiado. En los ensayos de viabilidad, se usaron filtros que tienen geometría abierta del canal de alimentación (tipo V). Para este tipo de filtros, era necesario un caudal relativamente alto de alimentación para proporcionar suficiente flujo. Debido a este hecho y a los resultados positivos obtenidos en los ensayos de viabilidad, se identificaron dos ultrafiltros, el Biomax y Ultracel. Ambos filtros poseen más estrechos canales de alimentación (tipo C). El Biomax está basado en una membrana de composite de polietersulfona mientras que el Ultracel es un composite de celulosa regenerada. La celulosa regenerada se selecciona a menudo para aplicaciones biofarmacéuticas debido a su propiedad de baja obturación.

Ambas membranas de ultrafiltración se compararon y se examinaron los otros parámetros del procedimiento durante once experimentos de filtración diferentes. Estos experimentos fueron diseñados usando el software MODDE. En base a los resultados, el filtro Ultracel parece dar un tiempo de filtración más corto. El aumento del caudal de alimentación también acorta el tiempo de filtración. Sorprendentemente, el estrangulamiento de la corriente de la fracción retenida no mostró un efecto significativo. Sin embargo, esto era debido probablemente al hecho de que la válvula de estrangulamiento no podía bloquear la corriente lo suficiente, incluso cuando estaba cerrada al 80%. Este fue el valor máximo en estos experimentos. Es obvio que limitar la corriente de la fracción retenida hace que se incremente el flujo de filtrado, hasta cierto punto. El experimento podría ser rediseñado usando un valor n superior y dejando de lado los factores que no mostraron ninguna influencia (por ejemplo, temperatura) para obtener resultados más exactos. Ambos filtros ensayados mostraron iguales rendimientos de proteína, de modo que la posible alta obturación de la membrana Biomax no es suficientemente significativa para provocar la pérdida detectable de proteínas.

Para el extracto de proteína ósea, el flujo crítico de 138 LMH se consiguió bajo TMP de 2,95 bar usando la membrana de polietersulfona de 10 kDa de corte de tipo C (Biomax, Millipore Corporation). En el caso de la membrana (Ultracel) de celulosa regenerada de tipo C de 10 kDa de corte de Millipore los valores correspondientes eran 144 LMH y 2,6 bar, respectivamente. En ambos casos no se alcanzó el valor crítico absoluto para el flujo debido a las limitaciones de la presión de alimentación. Para la comparación, la Biomax de tipo V dio un flujo crítico de 108 LMH a TMP de 2,5 bar.

Como se observó durante los estudios de optimización, los ultrafiltros de tipo C proporcionaron flujos mayores con caudales de alimentación más bajos en comparación con los filtros de tipo V. Los filtros de tipo A tienen los canales de alimentación más estrechos y más promotores de turbulencia. Por lo tanto, se podrían obtener con estos filtros flujos altos o incluso más altos comparados con los filtros de tipo C (y tipo V). Esto significa que se puede lograr la misma eficiencia, pero con caudales de alimentación más bajos, o menores costes de operación. Se necesita menos energía para el bombeo y también disminuye la resistencia de cizalladura de la bomba hacia el producto. El mismo tipo de optimización adicional se debe aplicar para la microfiltración. En este estudio se usó sólo un tipo de microfiltro (Biomax de tipo V con 1000 kDa de corte).

El análisis de la idoneidad de los protocolos de limpieza de membrana por medio de la monitorización de los cambios en la NWP mostró algunas diferencias entre la membrana de polietersulfona (Biomax) y la membrana de celulosa regenerada (Ultracel). El protocolo de limpieza estándar usando un litro de hidróxido de sodio 0,1 M a + 37°C durante 30 minutos fue suficiente para restaurar la NWP original. El mismo protocolo se usó para la membrana Biomax y fue capaz de restaurar el 90% de la NWP original en la mayoría de los casos (Figura 16). La NWP $\pm$ 20% del original típicamente da como resultado la reproducibilidad del procedimiento (Millipore 2000). Sin embargo, en aquellos casos en los que no se alcanzó suficiente NWP, la limpieza con NaOH 0,3 M a 45°C durante 45 minutos era necesaria para restaurar el 80% de la NWP original. Esto sugiere la obturación de la membrana. El filtro de Biomax puede necesitar limpieza con hipoclorito de vez en cuando.

Se ha estudiado la eficacia de limpiar los filtros Biomax y Ultracel después de la filtración de la disolución que contiene 2-25% de seroalbúmina humana (Millipore Corporation 2.000). Se mostró que la limpieza con NaOH 0,25 M a 40°C durante 60 minutos era suficiente para que la membrana Ultracel volviera a valores de NWP casi cercanos a los niveles iniciales. Un efecto similar se obtuvo para la membrana Biomax usando la misma disolución fortificada con 250 ppm de hipoclorito de sodio. Se debe verificar la retirada del cloro de la membrana después de la limpieza,

lo que requiere una etapa de análisis adicional.

Los cálculos para el aumento a escala del procedimiento de ultrafiltración, a pesar de no ser definitivos, dan una idea de cómo se puede hacer el aumento a escala. El procedimiento de 1.000 litros sugerido se puede completar en cuatro horas. Esto es porque se obtuvieron razonablemente altos flujos con ambas membranas (Biomax y Ultracel) incluso en comparación con los flujos presentados en la bibliografía.

8 Conclusiones

Se encontró que los filtros de cartucho eran apropiados para la micro- y ultra-filtración de flujo tangencial de extracto de proteína ósea. Sólo un tipo de filtro se sometió a estudios de microfiltración. El filtro usado era Biomax que utiliza polietersulfona como material de membrana. El valor de corte de peso molecular era de 1000 kDa y el tipo de canal de la malla era V. Se consiguió el flujo crítico de alrededor de 75 LMH. Los resultados se pueden mejorar introduciendo un filtro que posee canales de alimentación más cerrados, como el tipo C o A. Alternativamente, se pueden investigar para su uso en microfiltración filtros basados en celulosa regenerada. Se encontró que la celulosa regenerada era menos susceptible a la obturación que la polietersulfona en ultrafiltración.

La ultrafiltración se investigó usando tres filtros que tienen un valor de corte de peso molecular de 10 kDa. Eran Biomax que tiene un canal de malla de tipo V o C y Ultracel con canal de malla de tipo C. Los materiales de membrana eran polietersulfona y celulosa regenerada, respectivamente. Se encontró que el tipo C daba una mejor relación de flujo de filtrado a caudal de alimentación. Por lo tanto, los de filtros Biomax y Ultracel de tipo C se compararon adicionalmente. El flujo medio crítico obtenido era de 121 LMH para Biomax y 134 LMH para Ultracel. Los flujos obtenidos no eran los valores máximos para estos filtros debido a que el flujo se incrementaba linealmente con la presión transmembrana en ambos casos cuando se alcanzó el límite de presión de alimentación del equipo. Esto sugiere ensayos adicionales de filtros de tipo A. No dan necesariamente flujos medios críticos más altos en comparación con filtros de tipo C, pero los flujos se pueden conseguir usando más bajos caudales de alimentación.

Se estudiaron sistemáticamente diferentes parámetros que tienen influencia en el procedimiento de ultrafiltración usando un software (MODDE) para el diseño y análisis de experimentos. Los parámetros estudiados en relación con la duración de cada filtración y el rendimiento fueron la temperatura, caudal de alimentación (velocidad de la bomba), estrangulamiento de la corriente de la fracción retenida y la membrana. No se observaron diferencias significativas en el rendimiento. La membrana Ultracel dio una velocidad de filtración más rápida en comparación con el filtro Biomax. El aumento de la velocidad de alimentación tenía un efecto similar, como se esperaba. El experimento fue diseñado y evaluado con un método que no tiene en cuenta las interacciones entre los parámetros. Sería necesario un conjunto más amplio de experimentos para investigar a fondo las posibles interacciones.

Se observaron diferencias de limpieza entre las membranas de polietersulfona (Biomax) y de celulosa regenerada (Ultracel). Los resultados de limpieza se evaluaron mediante la comparación de los valores de NWP. La membrana de Ultracel se limpió de manera eficiente usando NaOH 0,1 M durante 30 minutos a +37°C. En muchos casos, las membranas Biomax requirieron limpieza usando NaOH 0,3 M durante 45 minutos a 45°C. Basado en la bibliografía, se sabe que la polietersulfona es más susceptible a la suciedad que la celulosa regenerada. Este tema podría ser estudiado de forma sistemática usando MODDE. El uso de cloro como un aditivo para la limpieza de las membranas de polietersulfona es una manera de mejorar los resultados. Puede acortar la duración de la limpieza y también sería posible usar más bajas temperaturas. Estas mejoras afectan directamente a la economía del procedimiento. Se podría incluso ensayar la limpieza a temperatura ambiente.

En este estudio, se usaron filtros Pellicon-2® fabricados por Millipore Corporation. Sería posible usar y ensayar filtros de otros fabricantes si tuvieran idénticas dimensiones exteriores. Sin embargo, ninguno de los datos obtenidos en este estudio sería aplicable a los otros filtros. La geometría interna de los filtros, la membrana y la clasificación de los valores de peso molecular de corte difieren entre los fabricantes. Los resultados, recomendaciones y cálculos para el procedimiento de aumento a escala son, por tanto, válidos sólo para los filtros específicos evaluados en este estudio.

9 Resumen

El propósito de este trabajo era estudiar la filtración de flujo tangencial con cartucho de extracto de proteína ósea. Cuando se procesan adicionalmente, las proteínas se pueden usar en implantes ortopédicos para mejorar el crecimiento óseo. La filtración de flujo tangencial se ha usado durante mucho tiempo en diversas aplicaciones industriales. En aplicaciones biofarmacéuticas, se prefieren a menudo filtros de cartucho debido a su escalabilidad lineal, alto rendimiento y la repetitividad de fabricación de lote a lote.

La parte teórica de este estudio exploró los diferentes diseños de equipo de filtración, diferentes tipos de membrana y sus propiedades. La ultrafiltración con cartucho y su uso en aplicaciones biofarmacéuticas era el objetivo principal de este estudio. También se trataron la obturación, la limpieza y el saneamiento de las membranas.

La parte experimental del estudio consistió en varios experimentos de filtración, la evaluación de la eficacia de la limpieza y la realización de cálculos de aumento a escala del procedimiento. El extracto se filtró primero a través de un cartucho que tiene un valor de peso molecular de corte de 1000 kDa. La etapa se consideró microfiltración,

aunque el formato de la membrana es el mismo que en un ultrafiltro. El tamaño de poro muy abierto, sin embargo, equivale aproximadamente al extremo inferior del intervalo de microfiltración (0,1 μm). El protocolo de optimización de parámetros para la membrana abierta es el mismo que para microfiltros. El filtrado de microfiltración se sometió a continuación a ultrafiltración a través de un cartucho que tiene un valor de corte de 10 kDa. Los parámetros que afectan a las filtraciones se estudiaron a fondo y se optimizaron.

Las dos marcas de filtros estudiadas para ultrafiltración eran Biomax y Ultracel. Biomax consiste en un material de membrana de polietersulfona mientras que la membrana Ultracel consiste en celulosa regenerada. El Biomax exhibió una ligeramente mayor obturación de lo que lo hizo el filtro Ultracel, sin embargo; también requirió condiciones de limpieza más severas. Como resultado de la obturación, el Ultracel produjo flujos ligeramente más altos y por lo tanto sería una mejor elección de filtro para el procedimiento final. No se pudieron alcanzar los flujos de filtrado críticos absolutos en ninguno de los dos casos. Son necesarios estudios adicionales usando filtros con canales de alimentación más cerrados tanto para microfiltración como ultrafiltración. Se podrían conseguir flujos de filtrado más altos con presiones más bajas, mejorando significativamente la economía del procedimiento.

Los cálculos para el aumento a escala del procedimiento se basaron en un volumen de lote de 1000 litros y un VCF de 5. Para los ultrafiltros ensayados, el procedimiento se podría completar en cuatro horas usando dos metros cuadrados de área total de filtro con un coste de alrededor de 9.000 €. Los mismos filtros se pueden usar a menudo durante años. Por lo tanto, el coste de la membrana por lote es moderado. La microfiltración no se optimizó tan a fondo como la ultrafiltración. Por lo tanto, no se realizaron cálculos para el aumento a escala. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos hasta el momento, el coste global de la etapa de microfiltración debe estar dentro del mismo intervalo que los costes de ultrafiltración.

El siguiente es un protocolo ejemplar para la extracción de hueso de reno. Las diferentes etapas descritas se pueden aplicar a otros protocolos similares por separado. Se describen también ejemplos de tales protocolos en las figuras 17 y 18. Las Figuras 19 y 20 muestran SDS-PAGEs de extractos nativos desmineralizados usando ácido fórmico o HCl.

1 Limpieza y molienda de hueso en bruto a gránulos óseos (todas las etapas de lavado realizadas a $<10^\circ\text{C}$).

1.1 Se pesaron huesos almacenados a -20°C y se cortaron y desecharon los extremos epifisiales del hueso. La superficie exterior se lava a alta presión con agua.

1.2 Se cortan los huesos con una sierra para hueso hasta aproximadamente longitudes de 10 cm y las superficies interiores se lavan con agua a alta presión. El lavado se efectúa para retirar la médula ósea y el tejido blando.

1.3 Después de lavar, los huecos corticales limpios se congelan en nitrógeno líquido durante aproximadamente 20 min, y a continuación se muelen hasta un tamaño de partícula de $1,0\text{ mm}^3$ usando un Heavy-Duty Cutting Mill SM 2000 (Retsh GmbH, Haan, Germany).

1.4 Los gránulos óseos se almacenan a -20°C

1.5 Se toma una muestra de cada lote molido para un recuento aeróbico viable total subsecuente (TVAC).

2 Desmineralización de gránulos óseos

2.1 Alrededor de 30 kg de gránulos óseos se lavaron tres veces en agua fría de ósmosis inversa (RO) ($<10^\circ\text{C}$) con un tiempo de mezcla de alrededor de 5 minutos por lavado. A continuación los gránulos óseos se desmineralizan en tres etapas con HCl 0,6 M diluido.

2.3 En la primera etapa de desmineralización se añaden 120 kg de agua de RO y alrededor de 40 kg de ácido clorhídrico (HCl) 2,4 M a los gránulos óseos lavados para conseguir una concentración de HCl de 0,6 M. El caudal de la alimentación de HCl es de alrededor de 2,4 l por minuto. La mezcla se realiza en un recipiente hecho a medida con enfriamiento (BBS Oy, Bioengineering) y se agita continuamente. La temperatura para esta etapa y todas las etapas subsecuentes de adición de HCl se mantiene a $<10^\circ\text{C}$. El pH y la temperatura se monitorizan continuamente.

2.4 Después de completar la alimentación de HCl y después de 15 minutos adicionales de mezcla, se detiene el mezclador y se deja que sedimenten los gránulos óseos durante 20 minutos. La mezcla de agua desmineralizada se retira por medio de una bomba peristáltica y se descarga como desecho.

2.5 Se realiza la segunda desmineralización idéntica a la primera etapa de desmineralización.

2.6 La tercera etapa de desmineralización se realiza añadiendo 120 kg de agua a la mezcla de gránulos óseos y añadiendo a continuación alrededor de 20 kg de HCl 2,4 M durante un periodo de 1 h. Se continua la mezcla durante aproximadamente 16 h hasta que el pH permanece constante entre 2,8 y 3,0 durante por lo menos dos horas. La mezcla de agua desmineralizada se retira a continuación por medio de una bomba peristáltica y se descarga como desecho.

2.7 El hueso desmineralizado se lava cinco veces con alrededor de 60 kg de agua de RO durante 15 minutos. El pH

del agua en la última etapa de lavado debe estar entre 2,4 y 2,6.

3 Extracción de la matriz ósea con hidrócloruro de guanidina (GuHCl)

5 3.1 Se añaden alrededor de 100 kg de GuHCl 4 M (GuHCl, NIGU Chemie GmbH) al hueso desmineralizado y se mezcla durante 22 h para extraer la proteína ósea. Los gránulos óseos desmineralizados y extraídos se dejan reposar durante 20 minutos, después de lo cual el extracto de GuHCl-proteína se recoge como producto. El pH y temperatura se miden continuamente.

3.2 Se realiza una segunda extracción de la misma manera, añadiendo alrededor de 100 kg de GuHCl 4 M al hueso extraído y mezclando durante 22 h. El extracto de GuHCl-proteína obtenido se junta con la primera extracción. Se mide el pH y debe estar entre un pH de 3,9 a 4,5.

10 3.3 La concentración de proteína total del extracto de GuHCl-proteína se determina por el método de Bradford después de la primera y segunda extracciones y debe ser de alrededor de 0,56 mg/ml $\pm$ 10%.

4 Centrifugación para retirar fase sólida y componentes de gel

4.1 El extracto de GuHCl-proteína se mantiene a $<10^{\circ}\text{C}$ en mezcla continua durante 24 h antes de la clarificación usando centrifugación de flujo continuo (CEPA Zentrifuge Z41). El material separado se descarga como desecho.

15 5 Filtración

5.1 El extracto de GuHCl-proteína obtenido se filtra usando filtros de cápsula de un solo uso (cápsula STAX de 20 m² con medio EKSP, Pall Life Science) o usando alternativamente MF-filtration de 0,2 μm (Pellicon, Millipore Corporation).

20 5.2 El extracto de GuHCl-proteína filtrado se concentra por UF-filtration a $<10^{\circ}\text{C}$, usando filtros de cartucho de 10 kDa (Pellicon, Millipore Corporation).

5.3 Al final de la etapa de ultrafiltración se recogieron alrededor de 26 kg de concentrado de UF y se almacenaron a $<10^{\circ}\text{C}$: El filtrado de UF se descarga como desecho.

6 Diálisis con agua

25 6.1 La diálisis con agua se realiza usando un equipo dializador hecho a medida (BBS Oy/Bioengineering) que contiene 10 membranas de diálisis tubulares. Las membranas de diálisis (Spectra/Por Dialysis Membrane, 34 ml/cm, MWCO: 12-14,000 Spectrum) se tratan con agua purificada durante 20 minutos antes de montar.

6.2 Las membranas de diálisis se cargan con el extracto de GuHCl-proteína concentrado a través de membranas asépticas, alrededor de 3 l por membrana.

30 6.3 Los parámetros establecidos para diálisis con agua son: duración 47 h, temperatura $<10^{\circ}\text{C}$, cantidad de agua de RO bombeada 16 l/h. La conductividad del interior de la membrana se mide continuamente con la conductividad final de 2,2-3,5 mS/cm. El precipitado insoluble en agua se hunde al fondo de la membrana durante la diálisis.

6.4 El precipitado y la fase acuosa se centrifugan a $<10^{\circ}\text{C}$ (CEPA Zentrifuge GLE) y el precipitado se recoge en forma de extracto húmedo. La cantidad de extracto húmedo es de alrededor de 160 g.

7 Redisolución y filtración antes de la diálisis con citrato

35 7.1 El extracto húmedo se redisuelve en GuHCl 4 M y se mezcla con un agitador magnético durante 16-20 horas. Se mide el pH y la conductividad. La conductividad se ajusta a 230 mS/cm con GuHCl 6 M filtrado. La temperatura durante la mezcla es $<10^{\circ}\text{C}$.

7.2 El extracto redissuelto se filtra a vacío a través de filtros de disco de 0,45 μm (GN-6 estéril, PALL) y 0,2 μm (Supor 200 estéril, PALL).

40 8 Diálisis con citrato

8.1 Se realiza diálisis con citrato usando un dializador hecho a medida (BBS Oy/Bioengineering).

8.2 La membrana de diálisis (membrana de diálisis Spectra/Por 4, 18 ml/c, MWCO: 12-14,000, Spectrum) se trata con tampón de citrato 0,25 M (pH 3,1) durante 20 minutos antes del montaje.

45 8.3 Los parámetros establecidos para diálisis son: 47 h, 9°C , 200 kg de tampón de citrato 0,25 M, capacidad de la bomba 16 l/h. La conductividad del interior de la membrana se mide continuamente. La conductividad final es usualmente 9,5-10 mS/cm.

8.4 El material insoluble en el tampón de citrato se centrifuga (rotor de tubo) a $<10^{\circ}\text{C}$. El tampón de citrato

transparente se decanta a los desechos y se retiene el precipitado.

9 Lavado y liofilización de precipitado

9.1 El precipitado se lava tres veces con agua WFI. Entre lavados se retira el agua por centrifugación

5 9.2 El precipitado lavado se pesa y se toman muestras para análisis. La cantidad de precipitado es de alrededor de 80 g con un contenido seco supuesto de 36%.

9.3 Se añaden excipientes (polisorbato 20, trehalosa, glicina, manitol) al precipitado como lioprotectores, y a continuación se introduce en bandejas de liofilización (Lyoguard).

9.4 La liofilización se realiza a -20°C en un liofilizador (Christ EPSILON 2 – 10D LSC).

Tabla 14. Las proteínas en extracto nativo desmineralizado con HCl

Las proteínas secuenciadas en extracto nativo	Definición	Función
Trombina	Proteína de coagulación	Estimulación de la resorción ósea
Vimentina	Proteína filamentososa de la célula	Estabilización del citoesqueleto
Vitronectina	Glicoproteína en la matriz extracelular	Promueve la adhesión y extensión celular, inhibe los efectos del daño a la membrana
Fosfoproteína 2 secretada, 24 kDa (Spp24)	Proteína de la matriz ósea, contiene el dominio de homología del receptor II TGFβ (TRH1).	Producto de degradación osteoinductiva (18,5 kDa)
Osteonectina	Glicoproteína de unión de calcio	Inicia la mineralización, remodelación ósea
Trombospondina	Proteínas de la matriz extracelular en hueso	Se une/activa factores de crecimiento, regeneración ósea
Lisil oxidasa	Enzima de cobre extracelular	Síntesis de colágeno y elastina (reticulación)
Condroadherina	Proteína de la matriz de cartílago	Media la adhesión de condrocitos, se une a colágeno
Biglicano	Proteoglicano pequeño rico en leucina (SLRP)	Remodelación y mineralización ósea, actúa junto con TGF-β y BMP-4
Dermatopontina (proteína de la matriz extracelular 22 K)	Proteína de la matriz extracelular con proteoglicano	Regula la interacción de TGF-beta y decorina, está implicada en la organización de la matriz de colágeno, promueve la mineralización ósea e inhibe los efectos de BMP-2 en precursores de osteoblastos.
Proteína Gla de la matriz	Proteína de la matriz que se une a calcio extracelular	Inhibe la calcificación de la matriz extracelular en arterias y el crecimiento de placa epifisial, proteína reguladora para BMP-2
Colágeno de tipo I	Proteína estructural fibrosa	Repara tejido dañado, proporciona resistencia, integridad y estructura
Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ-1)	Isoforma de TGFβ; factor de crecimiento sintetizado por células esqueléticas	Remodelación ósea, controla la proliferación y diferenciación celular
Lamina A/C (LMNA)	Proteínas de lamina nuclear	Forma lamina nuclear, factor requerido para la diferenciación de osteoblastos
Vitrina	Proteína de la matriz extracelular	Estabiliza la matriz extracelular
PEDF, factor derivado del pigmento del epitelio	Glicoproteína extracelular	Regulación de la formación de cartílago, hueso y angiogénesis

Evaluación de varias sales de calcio como estructuras para el extracto de proteína ósea en substitutos óseos.

1 Introducción

El hueso nativo contiene factores de crecimiento y diferenciación y moléculas de señalización, tales como proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) que son importantes para la regeneración de hueso y cartílago. Se requieren estos factores y moléculas y sus concentraciones específicas durante las diferentes fases de todo el proceso de curación de la fractura. De este modo, como un tratamiento de fractura ósea, el extracto de proteína ósea añadido requiere un sistema de suministro o soporte apropiado para evitar la migración desde el lugar de aplicación con una liberación gradual que da como resultado la formación de nuevo hueso.

Una matriz de soporte óptima debe cumplir varios criterios. La matriz debe ser biocompatible, bioabsorbible, maleable, y esterilizable. Los materiales inorgánicos cumplen estos requisitos, porque la mayoría de ellos son estructuralmente fuertes, inmunológicamente inertes, altamente osteoconductivos y variablemente biodegradables. Las sales de calcio, como materiales inorgánicos, se han usado durante años en diferentes variaciones debido a que la composición de este material es cercana a la de la composición de hueso natural.

Se ha mostrado que el fosfato de tricalcio (TCP) es un soporte útil para BMPs humanas recombinantes (rhBMPs) y matriz ósea desmineralizada (DBM). El TCP tiene muchas características positivas para el uso en implantes in vivo, tales como velocidades de resorción que coinciden estrechamente con el curso de remodelación de hueso esponjoso normal y se puede unir directamente al hueso y tiene una naturaleza principalmente osteoconductiva. El TCP es también más soluble que el hidroxiapatito (HAP). El HAP es relativamente osteoconductivo y tiene alta capacidad de unión a proteínas. La estructura continua del diseño del HAP proporciona una flexibilidad para conseguir alta porosidad y alta superficie específica, lo que hace al HAP un buen candidato para estructuras. Sin embargo, el HAP se combina a menudo con TCP para formar un soporte más resorbible y poroso con un mayor grado de formación de hueso. Esta combinación de fosfatos de calcio también se ha usado como soporte para rhBMPs y DBM. El sulfato de calcio se ha investigado como un relleno de huecos de huesos durante más de cien años y tiene muchas funciones como parte de un composite de injerto óseo. El sulfato de calcio actúa como aglomerante para mejorar el contacto óseo total y el volumen que rodea al implante. El tamaño de poro es importante para el crecimiento interno del hueso, e incrementar el tamaño de poro mejora los efectos de curación del hueso de materiales inorgánicos, tales como sulfatos de calcio. El sulfato de calcio se ha usado como un soporte para DBM durante varios años, y en estudios clínicos, ha mostrado excelente biocompatibilidad.

Una mezcla de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento y otras proteínas óseas han sido extraídas de materiales óseos de varias especies animales, seres humanos y tumores óseos. Trabajos anteriores han demostrado que el extracto de proteína ósea de reno es un estimulante eficaz para la formación de nuevo hueso en un modelo de bolsa muscular de ratón. Además, la buena capacidad de curación del extracto óseo de reno en un defecto óseo segmentario se demostró anteriormente en el conejo y la rata. La capacidad del extracto óseo de reno para curar diversos traumas óseos es mejor que la de otros extractos, por ejemplo, extracto bovino o de avestruz, que ha sido explicada por el hecho de que los renos renuevan sus cuernos anualmente. Además, se ha sugerido que más del material proteínico extraído del hueso de reno está en forma de monocomponente en comparación con otras especies, tales como bovino, ovino y porcino. El extracto de proteína ósea de reno es similar en composición, modo de fabricación, y uso deseado y aplicación a otros extractos de tejido óseo de origen animal. Los productos comparables más cercanos son Colloss® y Colloss® E, que son extractos óseos desmineralizados creados a partir de productos de matriz ósea desmineralizada humana (DBM), tales como pelets de DBM Osteoset®.

Este estudio fue diseñado para ser una evaluación in vivo de los componentes inorgánicos estructurales a combinar con extracto óseo de reno en un modelo de bolsa muscular de ratón heterotópico de mineralización ectópica inducida. Se usaron evaluaciones histológicas y radiográficas para determinar las respuestas del implante y la potencial formación de nuevo tejido óseo ectópico tres semanas después de la implantación.

2 Materiales y métodos

2.1 Extracto de proteína ósea

El extracto de proteína ósea se extrajo y purificó de hueso diafisario de reno (Jortikka L, Marttinen A, Lindholm TS.). La proteína morfogenética ósea de reno (Rangifer Tarandus) parcialmente purificada tiene una alta actividad de formación de hueso en comparación con algún otro artiodáctilo, Clin Orthop Relat Res 1993; 297: 33-7). El extracto de proteína ósea obtenida se liofilizó a -20°C grados usando excipientes (tensioactivo (polisorbato 20, Fluka, Sigma-Aldrich), lioprotector (D-(+)-trehalosa dihidrato, Fluka, Sigma-Aldrich), agente de carga (Glicina, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich) y tampón (D-manitol, Fluka, Sigma-Aldrich)).

El perfil proteínico y la bioactividad del extracto de proteína ósea seco se evaluaron usando el SDS-PAGE y el estudio del modelo de bolsa muscular de ratón (Fig. 22).

2.2 Materiales estructurales y grupos de estudio

Los materiales estructurales y grupos de estudio usados fueron: a) discos porosos que eran de 5 mm x 3 mm (Berkeley Advanced Biomaterials Inc, USA) con una composición de 30% de hidroxiapatito (HAP), 60% de fosfato de tricalcio (TCP), y 10% de sulfato de calcio (CS); b) discos porosos Cem-Ostetic (Berkeley Advanced Biomaterials Inc., USA), que eran de 5 mm x 3 mm con una composición de 90% de TCP y 10% de CS; c) polvo Cem-Ostetic® (Berkeley Advanced Biomaterials Inc., USA.) para masilla; d) polvo de CS hemihidrato (97%, Sigma-Aldrich) para masilla; e) discos no porosos (Berkeley Advanced Biomaterials Inc, USA) con una composición de 60% de HAP, 30% de TCP y 10% de CS; y f) gránulos de CS dihidrato con ácido esteárico con una composición de ácido esteárico 50, una mezcla de ácidos grasos que consistía principalmente en ácido esteárico y 40-60% de ácido palmítico (Fluka, Sigma-Aldrich).

2.3 Preparación de la muestra

El extracto óseo de reno liofilizado (3 mg, BBS-Bioactive Bone Substitutes Ltd, Finland) se reconstituyó en disolución salina fisiológica al 0,9% (Natriumchlorid, Fagron, Tamro, Finland) y se impregnó en los discos porosos (a, b) y el disco no poroso (e), o se mezcló con el polvo de Cem-Ostetic (c) y CS hemihidrato (d) para formar un disco moldeado, o se mezcló en seco con los gránulos de CS dihidrato y ácido esteárico (f) para formar un disco comprimido.

La pata derecha se usó como un control que contiene el respectivo soporte y los excipientes pero excluye el extracto óseo.

2.4 Animales

Se usó un total de 48 ratones de la raza BALB/c. Los animales fueron suministrados por el Laboratory Animal Centre, University of Oulu. Los animales eran de 7-12 semanas de edad en el momento del procedimiento. El esquema de estudio incluía 6 grupos con 8 animales por grupo.

Un ratón del grupo b murió el día del procedimiento sin ninguna causa obvia. Un ratón del grupo c murió el día del procedimiento debido a problemas respiratorios. Además, dos ratones del grupo d y un ratón del grupo f se sometieron a eutanasia dos días después del procedimiento porque tenían problemas caminando. Por lo tanto, 43 ratones sobrevivieron hasta el final del estudio.

2.5 Procedimiento quirúrgico

Se realizó cirugía bajo anestesia general con una mezcla de citrato de fentanilo (80 µg/kg) - fluanisón (2,5 mg/kg) (Hypnorm®, Janssen Pharmaceutica, Inc., Beerse, Bélgica) y midazolam (1,25 mg/kg) (Dormicum®, Roche, Basilea, Suiza). Ambas patas se limpiaron, y los ojos de los animales se trataron con gel de ojos para prevenir el secado. El ratón se colocó sobre un colchón térmico durante el procedimiento. Se hicieron incisiones en la piel transversales cerca de la columna vertebral en el sitio del fémur. A continuación, los implantes se introdujeron en ambas bolsas musculares del muslo en las patas traseras bilaterales. Después de la implantación, los músculos se cerraron con dos suturas, y la piel se cerró con una sutura.

La medicación contra el dolor post-operación consistía en buprenorfina (Temgesic®, Reckitt & Colman Pharmaceuticals, Inc, Richmond, Inglaterra) con una dosis de 0,01-0,05 mg/kg subcutáneamente. A los animales se les permitió plena actividad en sus jaulas después de la operación. Todos los animales se sometieron a eutanasia 21 días después del procedimiento, y se cosecharon las patas traseras.

El protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético institucional de experimentos con animales.

2.6 Evaluación radiográfica de la formación de hueso

Se usó la evaluación radiográfica (20 kV, 8,00 mAs, 0,32 s/exp, Mamex DC® ami, Orion Ltd., Soredex) para evaluar la formación de nuevo hueso y la resorción del implante. La formación de nuevo hueso y la resorción del implante se evaluaron midiendo el área opalescente en mm² (Osiris 4,19 Unidad Digital Imaging, Ginebra, software).

2.7 Examen histológico

Se prepararon dos muestras de cada grupo para histología. Las muestras se fijaron en formalina al 10% tamponada neutra, se descalcificaron en disolución de EDTA-formalina (pH de 7), se procesaron en un procesador de tejidos, y finalmente se incrustaron en parafina. A continuación, se prepararon cortes de 4.5 µm de grosor usando un microtomo y se tiñeron con hematoxilina-eosina. La calidad del nuevo hueso y la respuesta inflamatoria en el sitio del defecto se evaluaron por análisis histológico usando microscopía visible (Nikon Eclipse, E200, Japón).

2.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico para Windows SPSS (SPSS Inc., versión 15.0). Se usó el test de Kruskal-Wallis no paramétrico para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos. Se usó el test

de Mann-Whitney para la comparación por pares entre los grupos activo y de control. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los resultados de la evaluación radiográfica se dan como la media y las desviaciones estándar. Las diferencias entre los implantes activos y los controles se muestran como valores porcentuales.

5 3 Resultados

Para el Grupo a, la evaluación radiográfica de los discos de hidroxipatito-fosfato de tricalcio-sulfato de calcio (HAP: TCP:CS 30:60:10) demostró alguna formación de hueso fuera del implante activo; sin embargo, los implantes de control permanecieron intactos (Tabla 15, Fig. 23A). El área de medida era significativamente mayor para los implantes activos en comparación con los controles ($p < 0,01$). El análisis de la cosecha indicó que esta nueva formación era similar al hueso. La evaluación histológica demostró que se produjo formación de hueso endocondral en la muestra activa y no en la muestra de control (Fig. 23A, 23B).

Para el grupo b (TCP:CS 90:10), la evaluación de la radiografía muestra alguna formación de hueso fuera de los implantes activos; sin embargo, los implantes de control estaban casi intactos, y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los implantes activos y los controles (Tabla 15). La inspección visual durante la cosecha también indicó formaciones de hueso similares. La evaluación histológica mostró la formación de hueso endocondral en la muestra activa y no en la muestra de control.

Para el grupo c (el Cem-Ostetic), el análisis de la radiografía no muestra ninguna formación de nuevo hueso visual; sin embargo, la zona de medición era mayor en el grupo activo que en el grupo de control ($p < 0,01$) (Tabla 15). La cosecha y el análisis histológico confirmaron que no se encontró nuevo hueso en las muestras.

Para el grupo d (discos de sulfato de calcio hemihidrato), el análisis de la radiografía reveló alguna nueva formación de hueso, y las diferencias significativas ($p < 0,01$) eran evidentes entre los grupos activos y de control (el grupo de control se había resorbido visiblemente) (Tabla 15, Fig. 24B). Sin embargo, la cosecha y el análisis histológico mostró que no se encontró nuevo hueso en las muestras (Fig. 23C, 22D).

Para el grupo e (HAP/TCP/CS 60:30:10), la evaluación de la radiografía mostró alguna formación de hueso fuera del implante en el lado activo y alguna en los implantes de control (Tabla 15). Además, el grupo activo tenía un área de medida mayor que el grupo de control ($p = 0,001$). El análisis de la cosecha indicó que esta nueva formación era similar al hueso. La evaluación histológica reveló la formación de hueso endocondral y células del cartílago maduro en la muestra activa; sin embargo, no se encontró ninguna en la muestra de control.

Para el grupo f (sulfato de calcio dihidrato - ácido esteárico), el análisis radiográfico y el análisis de la cosecha revelaron la formación de nuevo hueso en el grupo del implante activo (Tabla 15, Fig. 24C.). La diferencia entre los implantes activos y los controles era estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Además, el análisis histológico reveló la clara formación de hueso y células de cartílago maduras y calcificadas en la muestra activa (Fig. 24F). No era evidente visualmente la formación de hueso en la muestra de control (Fig. 23E y 23F).

La comparación entre todos los grupos activos reveló que el Grupo f tenía el área de medida más grande, según lo determinado por el análisis radiográfico ($p < 0,05$). Además, los grupos c y d tenían áreas significativamente mayores que los grupos a, b y e ($p < 0,01$). También había una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos activos a y e ($p < 0,05$).

4 Discusión

El objetivo principal de este estudio era encontrar un candidato a vehículo inorgánico apropiado para extracto de proteína ósea de reno. Seis candidatos diferentes, incluyendo cuatro materias primas diferentes, fueron elegidos para evaluar la formación de hueso y la resorción de implante en el modelo de bolsa de ratón con una evaluación de seguimiento de tres semanas. En particular, el ácido esteárico - sulfato de calcio era un candidato de soporte alentador para el extracto de proteína ósea de reno.

El extracto de proteína ósea de reno tiene alta actividad de formación de hueso, como se ve en la bioactividad y los ensayos anteriores (Fig. 22.); sin embargo, en una situación de curación del hueso real, el extracto puede no funcionar sin un sistema estructural. Se establecen limitaciones de la selección del soporte por las características del extracto de proteína ósea de reno. La limitación principal es que el extracto no es soluble en agua. De este modo, hay por lo menos tres posibilidades diferentes para la preparación de implante. La primera es que la suspensión de extracto óseo formulada se puede impregnar en una matriz porosa. El segundo método consiste en moldear el extracto y el soporte juntos para formar masilla o comprimirlos en forma de discos, y en el tercer método, los discos o gránulos de soporte están revestidos superficialmente con el extracto óseo. Se ha ensayado como soporte colágeno puro en algunos de nuestros estudios anteriores. Se mezcló extracto liofilizado en agua y después se pipeteó sobre la esponja de colágeno; alternativamente, la esponja de colágeno se empapó en agua y a continuación, con el extracto, se envolvió para formar un implante. Los resultados de este método mostraron una buena formación de hueso en el modelo de bolsa de ratón y en el modelo de defecto segmentario; sin embargo, parece que el colágeno no soporta la funcionalidad de las proteínas de formación de hueso en el tiempo requerido. Por lo tanto, una alternativa inorgánica proporcionaría un marco mejor para el soporte del efecto de curación de

hueso del extracto. Previamente, hemos probado combinaciones de TCP, HAP y coral junto con el extracto y la esponja de colágeno en el modelo de ratón. Además, se encontró que el biovidrio era un soporte alternativo aceptable según se ensayó en el modelo de defecto de rata.

Este estudio se diseñó para encontrar alternativas para la selección del soporte, considerando la absorción de extracto óseo y las características de tamaño de poro del soporte. Con excipientes, el extracto liofilizado fue absorbido en los poros del grupo TCP:CS 90:10, parcialmente revestido en superficie y parcialmente absorbido en el grupo HAP:TCP:CS 30:60:10. Además, se usó el revestimiento de superficie en el grupo de HAP/TCP/CS 60:30:10. El extracto de proteína ósea de reno liofilizado se mezcla en el material de soporte de los grupos CSH y Cem-Ostetic y se mezcló en seco, sin resuspender el extracto liofilizado, para el grupo CSD-ácido esteárico. Debido a que la combinación de la formulación liofilizada y el soporte era diferente para cada grupo de estudio, la distribución y disponibilidad del extracto también era diferente para cada grupo; Por lo tanto, las comparaciones estadísticas entre los grupos de soporte no son válidas. Se usó el método roentgenografico nativo para determinar la actividad de los implantes en este estudio; sin embargo, este método no puede mostrar la formación de hueso en el interior de los restos del implante. El método de obtención de imágenes por microtomografía puede dar información más detallada sobre el crecimiento óseo y la resorción de soporte en estudios futuros. Sin embargo, la formación de nuevo hueso se ve claramente en el análisis histológico completado para este estudio.

Todos los grupos con extracto funcionaron mejor que los grupos de control sin extracto óseo. La mayor cantidad de formación de hueso se encontró en los grupos que tenían el extracto óseo fácilmente disponible, lo que indica que se requieren factores de formación de hueso en concentraciones suficientes durante la etapa anterior. Esto se vio particularmente en los grupos HAP/TCP/CS 60:30:10 y CSD-ácido esteárico. En los grupos TCP/CS 90:10, masilla Cem-Ostetic y CSH, se observaron diferencias entre los implantes activos y los controles, y los implantes funcionaron como un implante con un revestimiento de mezcla de proteína ósea. La cantidad mínima de formación de hueso se encontró en el grupo HAP/TCP/CS 30:60:10, lo que indica que el extracto óseo se absorbió profundamente en la estructura durante la preparación del implante, y la cantidad liberada de proteínas óseas era demasiado baja para inducir la formación de hueso. Estos resultados apoyan los de los estudios anteriores que mostraron que la formación de nuevo hueso depende de un contenido cerámico con una alta relación HAP/TCP y una alta dosis de proteínas óseas. Además, este estudio confirma que la presencia de componentes bioactivos redujo la formación de tejido fibroso e incrementó la formación de hueso que rodea las estructuras inorgánicas. Sin embargo, la cantidad y disponibilidad de proteínas óseas deben estar equilibradas con la curación del hueso y la formación en cascada.

Los productos de DBM son productos comparables para extracto de proteína ósea de reno. La cantidad comparable del producto de DBM disponible comercialmente se había ensayado también en el modelo de bolsa muscular, pero no se vio ningún signo de formación de hueso roentgenograficamente o histológicamente en 21 días (datos no mostrados). Esto indica que las proteínas en el extracto óseo de reno son más específicas para la inducción de nuevo hueso, y la capacidad de formación de hueso de proteínas óseas de reno extraídas es mucho mejor en comparación con la DBM.

Se sabe que la presencia de células óseas es esencial para la degradación de material de sulfato de calcio. Idealmente, la formación de hueso y la degradación de la estructura van una detrás de otra hasta que el área defectuosa ha sido substituida completamente por nuevo hueso. Si la formación de hueso no es suficiente para suministrar resistencia mecánica, entonces el material estructural se debe degradar lentamente para evitar la exposición de las características de soporte. Este estudio también reveló que el ácido esteárico había afectado positivamente a la mejora de crecimiento óseo interno y a la formación en el medio del soporte de sulfato de calcio. El ácido esteárico se ha usado ampliamente como un excipiente en la fabricación de comprimidos debido a que la adición de ácido esteárico disminuye la viscosidad de la suspensión cerámica incrementando la uniformidad microestructural del empaquetamiento de partículas. El ácido esteárico también se usa como parte de moldes de yeso. Se pulveriza ácido sobre la superficie del molde que se separa después del moldeado. A continuación, el ácido esteárico reacciona con el calcio en el yeso para formar una delgada capa de estearato de calcio, que funciona como un agente de liberación. Wright Medical Technology Inc. ha usado ácido esteárico como una ayuda de comprimido en sus productos de sulfato de calcio como Osteoset® y registró una buena capacidad de curación del hueso, como se encuentra en el trabajo previo de los autores. De este modo, la conclusión es que el estearato de calcio no sólo tiene propiedades de ayuda al comprimido, sino que también apoya la formación de hueso, de modo similar a la carboximetilcelulosa.

En conclusión, la mayor cantidad de formación de hueso se produjo en los grupos que tenían extracto óseo fácilmente disponible cerca de la superficie del implante. La combinación de TCP o CS y ácido esteárico parecía ser la alternativa de soporte más ideal para el extracto óseo de reno. También se sugirió que la formulación de materiales de soporte en forma de gránulos o en una forma inyectable incrementaría la eficacia de la formación de hueso. Esta hipótesis se ensayará en estudios adicionales.

Tabla 15. Análisis radiográfico de implante activo que contiene el extracto óseo y el control después de 21 días de seguimiento (área opalescente en mm²). Se muestra el porcentaje de incremento en comparación con el control.

Grupo	n	Activo, mm ² (SD)	Control, mm ² (SD)	% de incremento
a) HAP/TCP/CS 30:60:30	8	34 (6,08) ^a	25 (3,14)	36
b) TCP:CS 90:10	7	41 (12,22)	27 (1,41)	52
c) Cem-Ostetic	7	76 (6,49) ^{a,c}	50 (6,04)	52
d) CS hemihidrato	6	78 (13,47) ^{a,c}	44 (8,33)	77
e) HAP/TCP/CS 60:30:10	8	46 (12,87) ^{a,d}	25 (2,77)	84
f) CS dihidrato + ácido esteárico	7	97 (13,48) ^{a,b}	49 (13,88)	98
^a p<0,01 vs. control, ^b p<0,05 vs. otros grupos activos, ^c p<0,01 vs. (a), (b) y (e), ^d p<0,01 vs. (a)				

Evaluación de sulfato de calcio y β -TCP como soportes para extracto de proteína ósea derivada de reno en ovejas

5 Implantación y evaluación por métodos analíticos

Introducción

Se formaron defectos óseos como resultado de trauma o relacionados con cirugía de reconstrucción en los que se retiran partes de hueso debido a cambios destructivos de tejido. Los defectos óseos de tamaño crítico son aquellos en los que el hueso solo no es capaz de regeneración espontánea del hueco formado y necesita ayuda física para recobrar el hueco entre las partes de hueso.

Los presentes inventores han desarrollado un extracto de proteína ósea para su uso en cirugía ósea. Este extracto óseo de reno induce efectivamente la formación de nuevo hueso ectópico in vivo. El extracto de proteína ósea de reno se ha preparado a partir del hueso diafisario dando como resultado una mezcla de varias proteínas óseas.

El extracto de proteína ósea necesita una matriz de soporte para guiar la formación de hueso y para proteger las proteínas óseas de la lisis no específica. La matriz ideal debe ser biocompatible, bioabsorbible, maleable, y esterilizable. La matriz de soporte se debe unir al hueso huésped sin la formación de tejido de cicatrización, y reabsorberse a la misma velocidad que se regenera el hueso.

Están disponibles diferentes métodos de implantación y análisis. El primer producto estaba destinado para la fusión del tobillo. Se supuso que el modelo de defecto de agujero puede afinar lo suficiente para modelar la situación real. El modelo de defecto de agujero de oveja se ha usado ampliamente pero no se podría definir un claro modelo de defecto de tamaño crítico según la bibliografía. El tamaño del modelo más típico era un agujero de 9 mm x 6 mm, de este modo nosotros escogemos un tamaño de 10 mm x 6 mm.

Según la bibliografía diferentes métodos de obtención de imágenes e histológicos son los más usados y los más prácticos para mostrar la curación del hueso y las reacciones en un área de trauma óseo. El principal objetivo de este estudio era ensayar el sistema de funcionamiento del modelo de defecto de agujero de oveja y diferentes métodos de análisis.

Objetivos

Este estudio se diseñó para la evaluación del rendimiento in vivo de tres diferentes candidatos de soporte inorgánico combinados con extracto de proteína ósea de reno en un modelo de defecto de agujero de fémur de oveja. Otro objetivo de este estudio era proporcionar información metodológica para la planificación de futuros estudios de rendimiento. Estos incluyen el ensayo de los problemas técnicos del estudio de implantación (tamaño del defecto de tamaño crítico comparado con el tamaño del defecto que se encuentra en la bibliografía, métodos de operación con anestesia y analgésicos, observaciones clínicas, tolerancia local y recuperación del implante, manejo del material de ensayo, tiempo de seguimiento, y métodos analíticos) e información del procedimiento de curación del hueso con tres candidatos de soporte diferentes.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

El estudio ha sido aprobado por el Animal Care and Use Committee del Southern Finland Provincial Government, número de aprobación ESLH-2009-0568/Ym-23.

- 5 En este estudio se indujeron dos defectos de agujero con un diámetro de 6 mm y una profundidad de 10 mm en los cóndilos mediales femorales de las patas traseras de oveja con un taladro con anestesia general. La localización de los defectos se marcó con pequeños alambres K de titanio. Los agujeros taladrados del fémur izquierdo y derecho se llenaron con material de soporte y el extracto de proteína ósea de reno, o con el material de soporte solo, o se dejaron vacíos (controles sin tratar). La formación de nuevo hueso se determinó con fluorocromo en vivo. Después de un tiempo predeterminado los animales se sometieron a eutanasia y se cosecharon fémures para investigaciones de laboratorio adicionales ex vivo. El tiempo de seguimiento era de tres (n=5) y ocho semanas (n=5).

Los artículos de ensayo fueron (Tabla 16):

1. BBS001 F001: 30 mg/g de pelets de sulfato de calcio revestido en superficie
2. BBS001 F002: pelets de control de CS
- 15 3. BBS001 F003: gránulos de beta fosfato de tricalcio (β -TCP, alta porosidad, baja densidad) y gel -> pasta de polietilenglicol/glicerol (PEG/GLY).
4. BBS001 F004: gránulos de β -TCP (alta porosidad, baja densidad) con control de PEG-GLY
5. BBS001 F005: gránulos de beta fosfato de tricalcio (β -TCP, baja porosidad, alta densidad), y gel -> pasta de polietilenglicol/glicerol (PEG/GLY).
- 20 6. BBS001 F006: gránulos de β -TCP (baja porosidad, alta densidad) con control de PEG/GLY

Tabla 16: Artículos de ensayo

Código de grupo	Implante	Abreviatura
BBS001 F001	Sulfato de calcio, activo	CS activo
BBS001 F002	Sulfato de calcio, control	CS control
BBS001 F003	TCP de baja densidad, activo	TCPIId activo
BBS001 F004	TCP de baja densidad, control	TCPIId control
BBS001 F005	TCP de alta densidad, activo	TCPhd activo
BBS001 F006	TCP de alta densidad, control	TCPhd control
Vacío	Sin implante	Vacío

- 25 La composición objetivo del producto BBS001 F001 contenía alrededor de 30 mg de extracto de proteína seca para 1 g de producto, en el que el soporte estaba en la forma de pelets ligeramente cónicos de 3 mm x 3 mm. El volumen del defecto de 6 mm x 10 mm era de 0,238 ml, y podría incluir 6 pelets dando como resultado 4 mg de extracto por defecto.

- 30 El pelet de sulfato de calcio se fabricó por moldeo de beta sulfato de calcio hemihidrato (Sigma-Aldrich, 97%, código 12090) e incluía alrededor de 5% en peso de ácido esteárico (Meck PARTECK LUB STA (ácido esteárico de grado vegetal), PH EUR, lote K39557661). El extracto de proteína húmedo se revistió sobre los pelets con Tween 20 (Ph.Eur., código: 44112, Fluka, Sigma-Aldrich), CMC (Carmellos, Natr. Ph.Eur. Tamro) y PEG 400 (Macrogol 400, 0784710, Tamro). La composición final contenía 2,4% de extracto de proteína seco, 1,12% de CMC, 0,19% de PEG400, 0,036% de Tween 20, 91,4% de sulfato de calcio y 4,8% de ácido esteárico.

Las composiciones objetivo de los productos BBS001 F003 y BBS001 F005 contenían en volumen la misma cantidad de extracto seco que en BBS001 F001.

- 35 La fase PEG/GLY en los productos de BBS001 F003 y BBS001 F005 contenía 1,62% de extracto de proteína liofilizado, 38,1% de PEG 2K (Clariant, Kemi Intressen, código: 107903) y 60,3% de Glicerina (Croda, Kemi Intressen, código: pricerina 9095). El β -TCP en BBS001 F003 y BBS001 F005 era del tamaño de 300-500 μ m (Cambioceramics, lote GR090819B, alta porosidad, baja densidad y Cambioceramics, lote GR090819A, baja porosidad, alta densidad).

El extracto de proteína húmeda se liofilizó antes de mezclar con la mezcla de PEG/GLY. El extracto de proteína liofilizada seca contenía 0,35% de Tween 20 (Ph.Eur., código 44112, Fluka, Sigma-Aldrich), 0,79% de trehalosa dihidrato (para microbiología, Fluka, Sigma-Aldrich, código 90210), 4,1% de glicina (puriss, Ph.Eur., código; 32226, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich) y 10,9% de manitol (Ph.Eur., código: 17311, Fluka, Sigma-Aldrich).

- 5 La composición final del BBS001 F003 (alta porosidad, baja densidad) contenía 1,14% de extracto liofilizado, 29,7% de TCP, 42,4% de glicerina y 26,8% de PEG 2K.

La composición final del BBS001 F005 (baja porosidad, alta densidad) contenía 1,00% de extracto liofilizado, 37,8% de TCP, 37,5% de glicerina y 23,7% de PEG 2K.

Sistema de ensayo

- 10 Especie, raza, origen, cualidad, número de animales, edad

Se usaron corderas (oveja hembra) de la raza Soumeniammas (oveja finlandesa)

Los animales originarios de los rebaños de oveja reproductora finlandesa para la producción de carne y lana. Las corderas eran todas reproductoras varias veces. Los animales se habían adquirido para uso como animales de laboratorio.

- 15 Se usaron 11 animales en total en este estudio de investigación. Su edad media era 7 años y 7 meses.

Implante

- 20 La operación se realizó con anestesia general por inhalación, inducida por una inyección intravenosa de Propofol (5-7 mg/kg i.v., Propofol-®Lipuro, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) y se mantuvo con isoflurano en una mezcla de oxígeno-aire 1-1,5% (Isoba Vet, Schering-Plough A/S, Farum, Denmark). Antes de la anestesia las ovejas se premedicaron con Medetomidina-Ketamina (0.015 ml/kg i.m., Domitor® Vet (1 mg/ml), Orion Oyj, Espoo, Finland and Ketalar (50 mg/ml), Pfizer Oy, Helsinki, Finland) y se intubaron. Las ovejas se controlaron con un monitor cardíaco durante la operación.

- 25 Se les dio preoperatoriamente un parche de fentanilo (2 µg/kg/hora, Fentanyl ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) para 72 h de alivio del dolor. Adicionalmente, se inyectaron 2 ml de fentanilo (50 µg/ml i.m., Fentanyl-Hameln, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln, Germany) dos veces al día intramuscularmente durante las primeras 72 horas después de la operación.

Se inyectó amoxicilina (15 mg/kg i.m., Betamox® Vet, 150 mg/ml, Norbrook Laboratories Ltd, Newry, Nord-Ireland) como profilaxis antibiótica, subcutáneamente 24 h preoperatoriamente y una vez al día dos días postoperatoriamente.

- 30 Los implantes se colocaron bilateralmente dentro del defecto de agujero circular. Por lo tanto, los animales se inmovilizaron sobre su espalda y se afeitaron ambas patas y se desinfectaron con etanol. Se hizo una incisión longitudinal sobre la superficie medial del fémur y se expuso el cóndilo mediante disección roma. Los pequeños vasos sanguíneos abiertos se cerraron por diatermia. Se perforaron dos agujeros con un diámetro de 6 mm y una profundidad de 10 mm (taladro inalámbrico, Bosch PSR12-2). La distancia entre los defectos es por lo menos 1,5 cm. Primero se perforó un agujero piloto de 2 mm. Subsecuentemente, este defecto se amplió gradualmente usando brocas de tamaño creciente (3,5 mm y 4,5 mm) hasta un diámetro final de 6 mm (herramientas de calidad Magnum, HSSart 76035, 76045 y HSSart HSSart 76060). Los agujeros perforados se lavaron con disolución salina para eliminar restos óseos y se tamponaron con gasas para detener el sangrado. Mientras tanto, la situación de los defectos se marcó, usando pequeños alambres K de titanio en la parte frontal de los agujeros de perforación. Los agujeros se llenaron con artículo de ensayo, o se dejaron vacíos.

Finalmente, los tejidos subcutáneos se cerraron en capas con suturas Vicryl 2-0 resorbibles continuas, y la piel con suturas Mohosof 2-0. La piel alrededor del sitio del defecto se anestesió localmente con bupivacaína clorhídrica (5 mg/ml de Bicain, Orion Oyj, Espoo, Finland) y se desinfectó con povidona yodada.

Seguimiento

- 45 El tiempo de seguimiento fue de 3 semanas (n = 5 ovejas) o 8 semanas (n = 5 ovejas) después de la cirugía. Una oveja (P3) se sometió a eutanasia inmediatamente después de la operación debido a la extensa hemorragia.

Eutanasia y necropsia

- 50 Después de periodos de tiempo predeterminados, los animales se transportaron al Laboratory Animal Centre, donde se sometieron a eutanasia. La eutanasia se realizó con pentobarbital (60 mg/kg iv Mebunat® Vet, Orion Oyj, Espoo, Finland). Antes de esto, las ovejas fueron anestesiadas por una inyección intramuscular de ketamina-medetomidina (0,015 ml/kg i.m., Domitor® Vet (1 mg/ml), Orion Oyj, Espoo, Finland y Ketalar (50 mg/ml), Pfizer Oy, Helsinki, Finland).

Muestreo

Después de la eutanasia los fémures se extirparon y conservaron en hielo antes de la tomografía computarizada (CT). A continuación, los bloques de hueso que se van a tomar para análisis histológicos se conservaron en formalina tamponada al 10%. Antes de los análisis histológicos se obtuvo una imagen con micro-CT de una muestra de cada grupo.

Análisis de los datos**micro-CT**

Una muestra de cada grupo de estudio y puntos de seguimiento se escanearon usando micro-CT (SkyScan, microtomografía de rayos X, Universidad de Turku). Se analizaron dos muestras escaneadas analizados usando software CTAn (SkyScan).

Histología

Después de la obtención de imágenes de μ CT los huesos se fijan en disolución de formaldehído tamponado con fosfato (pH = 7,4), se deshidratan en concentraciones crecientes de etanol (70-100%) y se incrustan en metacrilato de metilo (MMA) para su procesamiento histológico.

Después de la polimerización, se preparan secciones delgadas en una dirección transversal al eje del implante usando una técnica de microtomo de corte modificado. Se cortaron secciones de cuatro micrómetros, y una sección se tiñó con tinción de Masson-Goldner Trichrome (MG) y una sección con tinción de hematoxilina eosina (HE).

El lugar de implantación se examinará para la evaluación de la formación de hueso, la resorción del material de soporte y tolerancia local.

Histomorfometría

Se examinaron secciones de cada implante por microscopía óptica. Todas las secciones teñidas con HE se fotografiaron (imagen de super alta calidad) por estereomicroscopía (Olympus SZX9, Europa, cámara: U-CMAD3, Japón, Universidad de Oulu, Laboratory of Process Metallurgy) por aumento 6,3x. Una imagen de una sola sección tintada se transfirió a la pantalla del ordenador y se escogió el sitio del defecto como región de interés (ROI). Se calculó el área de nuevo hueso en el sitio del defecto mediante software de procesamiento de imágenes y análisis (Fiji-win-32).

Métodos estadísticos

Debido al pequeño número de muestras (n = 3 en cada grupo), no se usaron métodos estadísticos.

Resultados**Micro-CT**

Se presenta un corte de muestra axial de la mitad de cada muestra (Fig. 25-30)

Cortes de TCP activo de baja densidad (3 semanas P2.3 y 8 semanas P7.3) se analizaron para mostrar como el resto de materiales de soporte se puede diferenciar de la formación de nuevo hueso. El principal resultado de esto era que la matriz de nuevo hueso que incluye gránulos era 25% en volumen después de 3 semanas de seguimiento y 46% en volumen después de un seguimiento de 8 semanas. El volumen de partículas sin unirse al nuevo hueso u otras partículas era 1,4% en volumen después de 3 semanas y solo 0,10% en volumen después de 8 semanas. Este método es apropiado para mostrar volumen de llenado y resorción de material de soporte en el defecto.

Análisis histológico e histomorfométrico

Resumen de comentarios sobre el análisis histológico:

1. BBS001 F001: Pelets de sulfato de calcio (CS activo),
 - . 3 semanas de seguimiento (Fig. 33)
 - Se puede encontrar restos de pelets
 - Formación de nuevo hueso en el lado defecto, no en el medio del defecto
 - . 8 semanas de seguimiento (Fig. 34)
 - Restos de pellets (partículas muy pequeñas)

- Formación de hueso alrededor de las partículas
- 2. BBS001 F002: pellets de CS de control
 - . 3 semanas de seguimiento (Fig. 35)
 - Lote de matriz fibrótica en todo el área del defecto
- 5 - Se puede encontrar pequeños restos de pellets
 - . 8 semanas de seguimiento (Fig. 36)
 - Los pellets se han resorbido
 - El Tejido fibrótico llenaba el defecto
 - Se puede encontrar algo de formación de hueso
- 10 3. BBS001 F003: pasta activa de β -TCPIId
 - . 3 semanas de seguimiento (Fig. 37)
 - Se puede encontrar restos de gránulos, pero no reacción de resorción
 - Formación de hueso también en la mitad del defecto, alrededor de gránulos
 - . 8 semanas de seguimiento (Fig. 38)
- 15 - Los osteoclastos resorben gránulos
 - Buena formación de nuevo hueso en el área del defecto
 - Unión ósea clara
- 4. BBS001 F004: Control de β -TCPIId
 - . 3 semanas de seguimiento (Fig. 39)
- 20 - Muchos restos de gránulos
 - Mucha matriz fibrótica en el área del córtex
 - Algunos gránulos alrededor del nuevo hueso
 - . 8 semanas de seguimiento (Fig. 40)
 - Muchos restos de gránulos
- 25 - Gránulos no tan resorbidos como en el caso activo
 - Formación de nuevo hueso alrededor de los gránulos
- 5. BBS001 F005: pasta activa de β -TCPhd
 - . 3 semanas de seguimiento (Fig. 41)
 - Matriz fibrótica en la superficie del agujero del defecto
- 30 - Muchos restos de gránulos, pero también buena formación de nuevo hueso
 - . 8 semanas de seguimiento (Fig. 42)
 - se puede ver una clara resorción de los gránulos
 - Formación de nuevo hueso alrededor de los gránulos en todo el sitio del defecto
 - Unión ósea clara
- 35 6. BBS001 F006: Pasta de control β -TCPhd
 - . 3 semanas de seguimiento (Fig. 43)
 - Restos de gránulos

- Mucha matriz fibrótica en el área del córtex
- Algunos gránulos alrededor del nuevo hueso

. 8 semanas de seguimiento (Fig. 44)

- Capa de tejido fibrótico muy gruesa

5 - Sin unión ósea

- Formación de hueso solo alrededor de los gránulos
- Algunos restos de los gránulos pero sólo en el borde del defecto

7. defecto vacío

. 3 semanas de seguimiento (Fig. 45)

10 - Sólo matriz fibrótica

. 8 semanas de seguimiento (Fig. 46)

- Mucho tejido fibrótico en el área del córtex
- Sin la formación de hueso en la mitad del defecto

15 La resorción de gránulos era más rápida en los grupos activos que en los grupos de control. Usamos dos tamaños de porosidad diferentes de gránulos de β -TOP. No se puede definir una clara diferencia entre los tamaños, aunque la resorción más rápida y mejor crecimiento óseo interno se observaron en el grupo de baja porosidad (grupo de TCPd activo). La diferencia de resorción entre los grupos de TCPd y TCPd después de 8 semanas de seguimiento se puede ver en las figuras 47 y 48.

Discusión

20 El objetivo principal de este estudio de investigación era encontrar un soporte candidato inorgánico apropiado para extracto de proteína ósea de reno y ensayar el funcionamiento y el método de análisis del modelo de defecto de agujero en ovejas. Se escogieron tres candidatos diferentes, incluyendo dos materias primas diferentes, para estudiar la formación de hueso y la resorción de implante en este estudio piloto con tres semanas y ocho semanas de seguimiento. Los métodos de operación y observación usados funcionaron bien y son utilizables en los estudios futuros. La mejor formación de hueso y curación del defecto se observó en los grupos de pasta que incluía β -TCP y

25 extracto óseo de reno liofilizado junto con polietilenglicol y glicerol.

BBS Ltd ha enfocado su primer producto en la fusión de tobillo. Se suponía que el modelo de defecto de agujero puede afinar lo suficiente para modelar la situación real. El tamaño más típico del modelo era un agujero de 9 mm x 6 mm de este modo hemos escogido un tamaño de 10 mm x 6 mm. Este era suficientemente grande porque no se veía ninguna cicatrización ósea en el defecto vacío después de 8 semanas. Ahora se usó el fémur pero si se piensa en el enfoque de este producto, un hueso metatarsiano de oveja es también un modelo de funcionamiento de hueso apropiado. Usamos alambres K para señalar el sitio del defecto. Esta era una idea buena y funcional. Especialmente, después de 8 semanas en algunos casos no estaba claro encontrar el defecto sin usar la ayuda de los alambres K. Además, se usaron alambres K para ayudar en la formación de imágenes de pQCT y en la

30 preparación de cortes histológicos (para encontrar el punto medio del defecto).

Se investigaron en este estudio tres alternativas de formulación diferentes con dos matrices diferentes. Ambos materiales inorgánicos usados son biocompatibles y osteoconductivos.

Pelets de sulfato de calcio con ácido esteárico se moldearon y secaron y a continuación se revistieron con extracto óseo de reno. Los pellets puros funcionaron como control. Una dosis incluía seis pellets que eran fáciles de configurar para el defecto. Los pellets mostraron una clara formación de hueso en Bioensayo (modelo de ratones). En este estudio de ovejas la resorción de los pellets era tan rápida que sólo se encontró en este grupo poca formación de hueso. Sin embargo, se puede encontrar el comienzo de unión ósea después de 8 semanas de seguimiento. Los pellets sin extracto no tenían el efecto de la formación de hueso. Se necesita optimizar la velocidad de resorción de pellets antes del estudio final. Tal vez, el tamaño de un pellet podría ser menor que el defecto

40 llenado, estaría disponible mejor y más área de proteína revestida. Esto podría mejorar el crecimiento interno de hueso en el defecto.

Otras dos formulaciones ensayadas estaban en forma de pasta. Se añadieron gránulos de beta fosfato de tricalcio (β -TCP) (dos tamaños de porosidad) y extracto óseo de reno liofilizado a pasta formada de polietilenglicol y glicerol. A continuación, la pasta se dosificó en jeringas. Sobre todo, era fácil inyectar la dosis de pasta dentro del defecto,

50 pero en algunos casos la pasta no se despegaba del pistón de la jeringa y una parte minúscula de pasta salía del

defecto. Esta puede ser una razón por la que no se ha visto crecimiento interno de hueso en el córtex del hueso, sólo en el mitad del defecto. La pasta no mostró clara formación de hueso en Bioensayo (TONA002.003) pero en este estudio de ovejas se encontró resorción de gránulos y formación de hueso, especialmente después de 8 semanas de seguimiento. El β -TCP es un material que solo es osteoconductor, de este modo encontramos formación de nuevo hueso también en los grupos de control. Pero la formación de hueso era alrededor de los gránulos y no se veía crecimiento interno de hueso. Además, la resorción de los gránulos era más rápida en los grupos activos que en los grupos de control. Usamos dos tamaños de porosidad diferentes de gránulos de β -TCP. No se puede definir una clara diferencia entre tamaños, aunque la resorción más rápida y el mejor crecimiento óseo se observaron en el grupo de baja porosidad (grupo de TCPhd activo). Se necesita optimización de la velocidad de resorción de la pasta antes del estudio final. La pasta (PEG y GLY) con gránulos se debe mantener en el defecto más tiempo para que sea también posible el crecimiento interno de hueso en la parte del córtex del hueso.

En los estudios de investigación de material inorgánico los puntos de seguimiento ampliamente usados son de 3 a 12 semanas, dependiendo del material y modelo de defecto usados. En este estudio usamos seguimientos de tres semanas y ocho semanas. El primer punto de tiempo sólo mostró el comienzo de la formación y la resorción de material. El área operada (herida, músculos) ya se había curado en tres semanas. El segundo punto de tiempo mostró una clara diferencia entre los grupos activo y de control, y ninguna formación de hueso en defectos vacíos. Pero no se observó crecimiento óseo completo en los grupos activos después de ocho semanas. Especialmente, los grupos de TCP implicados necesitan más tiempo de seguimiento para que la resorción de gránulos se pudiese definir claramente. En el siguiente estudio el seguimiento podría ser de entre 8 a 16 semanas.

Los mejores y más informativos resultados de la obtención de imágenes se obtuvieron de μ CT. Esta da imágenes de mayor resolución y de este modo información más detallada de la formación de nuevo hueso y la resorción de soporte que la TC normal. En este estudio se analizaron sólo dos muestras del ejemplo por μ CT pero es muy alentador usar el método como principal método de análisis en el futuro. También es recomendable obtener algunas imágenes justo después de la implantación. De este modo, se tiene información, de cómo se ha conseguido su implantación y de cómo los valores del análisis de obtención de imágenes están en el llamado punto nulo.

Después de la obtención de imágenes las muestras se enviaron a histología. Se usaron dos métodos de tinción. Especialmente, la tinción de Masson Goldner Trichrome mostró la formación de nuevo hueso y la resorción de soporte, porque esta tinción es específica para el hueso. Se midió el área de nuevo hueso en el sitio del defecto histomorfométricamente tomando fotografías con microscopio estereoscópico. Pero sólo un corte de cada grupo era tan bueno que la medida era aceptable. La mayoría de los cortes se rompieron o hubo algunos otros problemas que hicieron imposible el análisis cuantitativo. Aunque fue posible ver en histología la formación de hueso y la curación de defectos, tenemos que tener más en cuenta la calidad del corte en el futuro para que fuese posible que la medida cuantitativa mostrara diferencias entre los grupos.

Conclusión

El defecto de agujero de este tamaño es un defecto de tamaño crítico y por lo tanto es apropiado para la evaluación de los efectos de curación de hueso de los dispositivos médicos de investigación. La operación, anestesia y métodos de análisis usados son utilizables también en los futuros estudios de esta raza de ovejas. Tanto el sulfato de calcio como el fosfato de tricalcio son materiales de soporte apropiados, pero se necesita la optimización de la formulación. Parece que una forma de formulación que llena todo el defecto en el inicio de la cascada de curación del hueso es la mejor alternativa. El efecto de curación del hueso era realmente mejor y excelente en el defecto tratado con implantes activos en comparación con los defectos de control.

Rendimiento de la formación de hueso de formulaciones de extracto de proteína ósea de reno, autoinjerto y matriz ósea desmineralizada en modelo de defecto de agujero de oveja

1 Introducción

El autoinjerto es el método tradicional de mejora de la reparación ósea, pero la cosecha de injertos óseos puede conducir a complicaciones, tales como sangrado, dolor e infección. Los autoinjertos tienen también limitada disponibilidad de este modo, como una alternativa, se usan muchos materiales inorgánicos. Los fosfatos de calcio, tales como hidroxipatito (HAP) y fosfatos de tricalcio (TCP) y sus variaciones son comúnmente conocidos materiales de sustitución ósea. Estos materiales proporcionan una estructura osteoconductor para la formación de nuevo hueso.

La bioactividad de materiales inorgánicos se puede aumentar mediante la adición de estímulo osteogénico al extensor de injerto óseo. Los aloinjertos, matrices óseas desmineralizadas (DBM) y extractos óseos nativos se ha demostrado que aumentan la capacidad de curación del hueso y mejoran la integración en muchos estudios diferentes. Se ha mostrado que las combinaciones de factores de crecimiento derivados de hueso de bovino en colágeno y soportes de DBM o HAP coralino son tan buenas como los autoinjertos de cresta ilíaca cuando se estudian como velocidades de fusión en artrodesis espinal en conejos y monos y seres humanos.

El extracto de hueso de reno es una mezcla de colágeno y factor de crecimiento extraída de la matriz extracelular del hueso diafisario cortical. Los extractos de proteína ósea de reno son similares a los extractos de tejido óseo de

origen animal en la composición, modo de fabricación, y el uso y la aplicación deseada. Los productos comparables más parecidos son Colloss® y Colloss® E, que son extractos óseos desmineralizados creados de productos óseos ovinos y equinos, y matriz (DBM) ósea desmineralizada humana, tales como pelets de DBM osteoset®.

Para el estudio actual, se lanza la hipótesis de que los implantes de extracto óseo de reno tienen la capacidad de formación de hueso equivalente o mejor que el autoinjerto óseo o matriz ósea desmineralizada usando el modelo de defecto de agujero de oveja. Para ensayar la hipótesis, se comparó la capacidad de diferentes formulaciones de extractos óseos de reno para estimular la formación y reparación de hueso en el modelo de defecto de agujero de Nuss et al. 2008. Los resultados se compararon con los defectos no tratados, y los defectos llenos con cerámica de beta fosfato de tricalcio (β -TCP), matriz ósea desmineralizada disponible comercialmente (Grafton® DBM), y autoinjerto.

2 Materiales y métodos

2.1 Extracto de proteína ósea

El extracto de proteína ósea se extrajo y se purificó del hueso diafisario de reno como se describe previamente (Jortikka et al. 1993). El extracto de proteína ósea obtenido se liofilizó a -20°C usando excipientes (tensioactivo (polisorbato 20, Fluka, Sigma-Aldrich), lioprotector (D-(+)-trehalosa dihidrato, Fluka, Sigma-Aldrich), agente de carga (Glicina, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich) y tampón (D-Manitol, Fluka, Sigma-Aldrich))

2.2 Los artículos de ensayo y grupos de estudio

Los artículos de ensayo y grupos de estudio se muestran en la tabla 17.

2.3 Preparación de la muestra

Polietilenglicol 2000 (PEG), glicerol y ácido esteárico se calentaron hasta que se formó una mezcla transparente. La mezcla se enfrió con agitación continua para formar una pasta opalescente, después de lo cual se añadieron las cantidades requeridas del extracto óseo liofilizado y gránulos de TCP. La pasta formulada se envasó en jeringas y se cerró en bolsas de lámina de aluminio. Todas las muestras se fabricaron en una cabina de flujo laminar para reducir la biocarga, y a continuación se esterilizó con rayos gamma terminalmente (15 kGy).

En el grupo de autoinjerto el material óseo se retiró de los sitios de agujero de ensayo de la misma oveja usando cincel y taladro de trepanación.

2.4 Animales

Se usó un total de 10 corderas sanas de la raza de oveja del archipiélago finlandés. Los animales eran de tres años de edad y sus pesos corporales eran de 52 a 59 kg.

Los sitios de implante fueron la parte esponjosa próxima de la diáfisis y epífisis distal de húmero y fémur. Esto proporcionó un total de 8 sitios de implante diferentes por animal. El protocolo de estudio se llevó a cabo según las leyes finlandesas de bienestar animal y fue aprobado por el comité ético institucional de experimentos con animales. Todos los animales sobrevivieron durante las 8 semanas de seguimiento.

2.5 Procedimiento quirúrgico

La operación se realizó bajo anestesia general por inhalación, inducida por una inyección intravenosa de propofol (5-7 mg/kg, i.v.,®Lipuro, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) y se mantuvo con isoflurano en una mezcla oxígeno-aire 1-1,5% (Isoba Vet, Schering-Plough A/S, Farum, Denmark). Antes de la anestesia las ovejas se premedicaron con Medetomidina (0,015 ml/kg i.m., Domitor®Vet, Orion Oyj, Espoo, Finland) y se intubaron. Las ovejas se controlaron con un monitor cardíaco durante la operación.

Se les dio antes de la operación un parche de fentanilo (2 $\mu\text{g/kg/hora}$, Durogesic®, fentanilo ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) antes de la operación durante 72 horas para el alivio del dolor. Adicionalmente, se inyectó intramuscularmente durante las primeras 72 horas después de la operación 2 ml de fentanilo (50 $\mu\text{g/ml}$ i.m., Fentanyl-Hameln, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln, Germany). A continuación se inyectó buprenorfina (0,3 mg/dosis i.m., Temgesic®, Schering-Plough Europe, Bruselas, Bélgica) dos veces al día de forma continua durante dos días o más después de la operación cuando se retiró el parche.

Se inyectó amoxicilina (15 mg/kg i.m., Betamox® Vet, 150 mg/ml, Norbrook Laboratories Ltd, Newry, Nord-Ireland) como profilaxis antibiótica, por vía intramuscular en la mitad anterior del cuello 24 h antes de la operación y una vez por día durante dos días después de la operación.

Se indujeron defectos de agujero en los cóndilos distales y proximales del fémur y húmero de las patas trasera y delantera de la oveja con un taladro como se describe por Nuss et al. (2006). Se taladró un agujero con un diámetro de 6 mm y una profundidad de 10 mm (taladro inalámbrico, Bosch PSR12-2). El taladro se lavó con disolución salina para eliminar restos de hueso y se tamponó con gasas durante varios minutos para detener el sangrado. Mientras

tanto, la localización del defecto se marcó usando postes dentales de endodoncia de fibra de vidrio radiopacos de 1,0 mm (Snowpost refill, Plandent Oy, Helsinki, Finland). Los postes se cortaron a la longitud apropiada con un disco de diamante. Los agujeros perforados se llenaron según la tabla de asignación al azar con los materiales de ensayo o se dejaron vacíos (controles no tratados). Finalmente, los tejidos subcutáneos se cerraron en capas con suturas resorbibles continuas Polysorb 3-0 y piel con suturas no resorbibles Monosof 2-0.

Después del período de tiempo predeterminado de 8 semanas, los animales se sometieron a eutanasia y se tomaron muestras de hueso para su análisis. Las eutanasias se realizaron con pentobarbital (60 mg/kg i.v. Mebunat® Vet, Orion Oyj, Espoo, Finland). Antes de esto, las ovejas se anestesiaron por vía intramuscular con medetomidina (0,015 ml/kg de Vet Domitor®, Orion Oyj, Espoo, Finland y 0,04 ml/kg de Ketalar®, Pfizer Oy, Helsinki, Finland).

Después de la eutanasia los huesos se extirparon y conservaron en hielo. A continuación, los bloques de hueso se conservaron en formalina al 4% tamponada los primeros siete días y a continuación en etanol al 70%. Algunas muestras se rompieron en la fase de extirpación y se han eliminado del análisis.

2.6 Evaluación de micro-CT de la formación de hueso

Las muestras se escanearon usando microtomografía computarizada (μ CT) (SkyScan, microtomógrafo de rayos X, Universidad de Turku). Las muestras escaneadas se analizaron usando software CTAn (SkyScan). Además, se llevó a cabo el análisis de radiografía de imágenes de micro-CT para mostrar la formación de nuevo hueso y la resorción de la estructura.

2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS para Windows. Se usó el ensayo de Kruskal-Wallis no paramétrico para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos. El ensayo U de Mann-Whitney se usó para las comparaciones por pares entre los grupos de tratamiento de extracto de proteína ósea, grupo de autoinjerto y los grupos de control. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3 Resultados

Para los grupos de pasta 1 y pasta 2 (el extracto de proteína ósea y Cambioceramics TCP en matriz de PEG-GLY con ácido esteárico) las evaluaciones de micro-CT mostraron una buena formación de hueso en el área del defecto con ambas cantidades de extracto de proteína ósea aunque había áreas corticales sin nuevo hueso o restos de gránulos de TCP. Casi todos los gránulos de TCP se habían resorbido durante el seguimiento. En el grupo de control, la pasta 3 (Cambioceramics en matriz de PEG-GLY con ácido esteárico, sin el extracto de proteína ósea), las evaluaciones de micro-CT mostraron que los gránulos de TCP aún no se habían resorbido y se habían empaquetado en forma de una masa gruesa en el fondo del defecto. Sin embargo, había formación de nuevo hueso en esta masa de gránulos alrededor de los gránulos. Para el otro grupo de control, gránulo (TCP Cambioceramics puro), las evaluaciones de micro-CT mostraron que los gránulos implantados habían llenado todo el área del defecto. Los gránulos no se habían absorbido durante el seguimiento, pero se había visto alguna formación de nuevo hueso alrededor de los gránulos.

Para los grupos de pasta 4 (el extracto de proteína ósea y TCP Cerasorb® M en matriz de PEG-GLY con ácido esteárico) las evaluaciones de micro-CT mostraron la formación de hueso en el área del defecto aunque había áreas corticales sin nuevo hueso o restos de gránulos de TCP. Casi todos los gránulos de TCP se habían resorbido durante el seguimiento. Para el grupo de control, la pasta 6 (TCP Cerasorb® M en matriz de PEG-GLY con ácido esteárico, sin el extracto de proteína ósea), las evaluaciones de micro-CT mostraron que la mayoría de gránulos de TCP aún no se habían resorbido y se habían empaquetado en forma de una masa espesa en el fondo del defecto. La formación clara de nuevo hueso era difícil de ver.

Para la pasta del grupo 5 (el extracto de proteína ósea y TCP Cerasorb® en la matriz de PEG-GLY con ácido esteárico) las evaluaciones de micro-CT mostraron una clara y muy buena formación de nuevo hueso en el área del defecto. Casi todos los gránulos de TCP se habían absorbido durante el seguimiento. Aun había el mismo problema que en los otros grupos que incluían matriz de PEG-GLY y ácido esteárico que el implante (gránulos) no había llenado todo el defecto y había algunas zonas vacías, especialmente en el sitio cortical.

Para el grupo de autoinjerto las evaluaciones de radiografía mostraron la clara formación de hueso y remodelación del hueso en el área del defecto. No se veían áreas vacías en los sitios corticales, excepto un par de defectos.

Para el grupo de matriz ósea desmineralizada grafton (DBM Grafton Plus®) y en el grupo de evaluaciones de micro-CT no tratado las evaluaciones no mostraron formación de nuevo hueso en los sitios de defecto durante el seguimiento.

El valor del volumen óseo se midió a partir de micro-CTs por análisis de imágenes (Fig. 21). El volumen óseo más alto se observó en los grupos de la pasta 5 y el autoinjerto, mientras que el volumen óseo más bajo estaba en los grupos de la matriz ósea desmineralizada y de defectos vacíos. En las comparaciones estadísticas todos los demás grupos fueron significativamente mejores que el grupo de la matriz ósea desmineralizada (DBM Grafton Plus®).

($p < 0,02$). Todos los grupos de implante de proteína ósea, el grupo de autoinjerto y también otros grupos de control excepto el grupo de DBM se habían curado significativamente mejor que los defectos no tratados ($p < 0,02$). El grupo de autoinjerto era significativamente mejor en volumen óseo que el grupo de pasta 4 ($p < 0,02$) y casi significativamente mejor que el grupo de pasta de 6 ($p < 0,06$). El grupo de pasta 5 era casi significativamente mejor en volumen óseo en comparación con el grupo de pasta 4 ($p = 0,064$).

4 Discusión

Los objetivos de este estudio eran comparar tres desarrollos de formulaciones de extracto de proteína de reno con autoinjerto, y rellenos óseos comercialmente disponibles (partículas de matriz ósea desmineralizada y fosfato de tricalcio) por su capacidad para formar nuevo hueso usando un modelo de defecto de agujero de hueso esponjoso de oveja. Además, el propósito era proporcionar información sobre el efecto potencial de la concentración de proteínas en la formulación sobre la capacidad de curación del hueso y para proporcionar información preliminar sobre la biocompatibilidad de las formulaciones. Se encontró que el planeado y probado dispositivo médico que incluye el extracto de proteína ósea de reno y la formulación de β -TCP en forma pasta inyectable es una alternativa apropiada para el tratamiento óseo de autoinjerto usado hoy en día.

El extracto de proteína ósea de reno tiene actividad de formación de hueso elevada, como se ve en la bioactividad y los ensayos anteriores; sin embargo, en una situación real de curación de hueso, el extracto puede no funcionar sin un sistema estructural. Las limitaciones de la selección del soporte están establecidas por las características del extracto de proteína ósea de reno. La limitación principal es que el extracto no es soluble en agua. De este modo, hay por lo menos tres posibilidades diferentes para la preparación de implante. La primera es que la suspensión de extracto óseo formulada se puede impregnar en una matriz porosa. El segundo método consiste en moldear el extracto y el soporte juntos para formar masilla o comprimirlos en forma de discos, y en el tercer método, los discos de soporte o gránulos están revestidos en superficie con el extracto óseo. El colágeno puro ha sido probado como un soporte en estudios previos. El extracto liofilizado se mezcló en agua y después se pipeteó sobre la esponja de colágeno; Alternativamente, la esponja de colágeno se empapó en agua y a continuación, con el extracto, se enrolló para formar un implante. Los resultados de este método mostraron una buena formación de hueso en el modelo de bolsa de ratón y en el modelo de defecto segmentario; sin embargo, parece que el colágeno no soporta la funcionalidad de las proteínas de formación de hueso en el tiempo requerido. Por lo tanto, una alternativa inorgánica proporcionaría un mejor marco para el soporte del efecto curativo del hueso del extracto. Previamente, hemos ensayado combinaciones de TCP, HAP y coral junto con el extracto y la esponja de colágeno en el modelo de ratón. Además, se encontró que el biovidrio era un soporte alternativo aceptable según lo ensayado en el modelo de defecto de rata.

Varias alternativas de sal de calcio también se ensayaron en un modelo de ratón. Este estudio mostró que un sistema estructural inorgánico es un soporte muy apropiado para el extracto de proteína ósea de reno. Los resultados del presente estudio apoyaron estudios previos de que la formación de nuevo hueso depende del contenido cerámico con una alta proporción de HAP/TCP y alta dosis de proteínas óseas. Además, este estudio confirma que la presencia de componentes bioactivos redujo la formación de tejido fibroso y el aumento de la formación de hueso alrededor de estructuras inorgánicas. Sin embargo, la cantidad y disponibilidad de proteínas óseas debe estar en equilibrio con la cascada de formación y curación del hueso. En nuestro estudio piloto preliminar en ovejas (datos no mostrados) encontramos que los gránulos de β -TCP pueden ser mejor material estructural que el sulfato de calcio porque el TCP tiene menor velocidad de resorción. Sin embargo, sin extracto óseo la resorción de TCP es también demasiado lenta. Por otra parte, nuestro estudio de modelo de ratón mostró que el ácido esteárico puede añadir capacidad de formación de hueso del extracto de proteína ósea de reno con estructura de calcio.

Según esta información previa preparamos implantes que incluyen el extracto de proteína ósea de reno formulado junto con gránulos de β -TCP disponibles comercialmente en matriz de PEG-GLY con ácido esteárico. La forma de dosificación era una pasta inyectable que era posible cuando se usó matriz de PEG-GLY. El PEG se usa ampliamente como precipitado en la fabricación de medicinas y, por ejemplo, se usa en varias pastas de dientes como dispersante porque tiene una baja toxicidad, se une al agua y ayuda a mantener la goma uniforme en toda la pasta de dientes. También el glicerol (GLY) se usa ampliamente en formulaciones farmacéuticas para mejorar la suavidad y proporcionar lubricación. El implante era fácil de hacer y no se necesitaba ninguna mezcla adicional de producto en la mesa de operaciones. Sin embargo, el análisis mostró que la cantidad usada de gránulos no era suficiente para cubrir toda el área del defecto después de que se disolvió la matriz, lo que provocó que el sitio cortical del defecto estuviera usualmente vacío y sin nuevo hueso o resto de gránulos. Esto se comparó con el grupo de TCP puro en el que la cantidad de gránulos era el doble y toda el área del defecto estaba llena de los gránulos también después del seguimiento. De este modo, el efecto de curación del hueso no se puede comparar solo por la diferencia en la formación de hueso entre los grupos de estudio, y se necesita la optimización de la matriz de PEG-GLY junto con el ácido esteárico y gránulos. Idealmente, la formación de hueso y la degradación de la estructura se suceden hasta que el área del defecto ha sido remplazada completamente por nuevo hueso. Con tal de que la formación de hueso no sea lo suficientemente extensa para suministrar resistencia mecánica, el material estructural se debe degradar tan lentamente que no se exponga la característica del soporte. El análisis de las radiografías mostró que la resorción de los gránulos era más rápida en el grupo que incluye el extracto de proteína ósea, pero se vio también una buena formación de nuevo hueso y estaba en marcha la remodelación ósea. En el grupo que incluía

sólo gránulos o gránulos con matriz de PEG-GLY y ácido esteárico no se observó la resorción de gránulos. Se vio formación de hueso pero usualmente sólo alrededor de los gránulos. En nuestro estudio piloto preliminar (datos no mostrados) esta formación de hueso era como una capa de fosfato apatito alrededor de los gránulos y no se vio una unión ósea real entre gránulos. Esto confirma los resultados de que el extracto de proteína ósea aumentó la bioactividad de materiales inorgánicos. La obtención de imágenes de histología y microscopía electrónica de barrido (SEM) pudo confirmar nuestra conclusión del resultado de micro-CT. El más alto volumen óseo y formación de hueso se observó en el grupo que incluía una forma más pequeña y esférica de gránulo de TCP. Se ha encontrado que la forma, figura y micro- y nano-estructuras de la estructura afectan tanto a las propiedades de resorción ósea como de formación de estructuras. Posiblemente, la forma de gránulo mejoraba la fijación de proteínas óseas, factores de crecimiento y moléculas de señalización a la superficie de los gránulos y la estructura funcionaba lo más óptimamente en este grupo.

La DBM Grafton Plus® ha sido autorizada por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos (510k) como sustituto de injerto óseo, extensor de injerto óseo y relleno de huecos de huesos en huecos óseos o espacios del sistema esquelético. Los productos DBM Grafton han sido ampliamente usados y se han publicado buenos resultados de curación en varios modelos animales, especialmente con ratas y conejos. También tiene buenos resultados clínicos como tratamiento de problemas de la columna vertebral. De este modo, era sorprendente que la matriz ósea desmineralizada no funcionara en el presente estudio. Hay algunos estudios en la bibliografía en los que se encontraron diferencias de curación ósea entre diferentes productos de DBM comercialmente disponibles. Además, la DBM tiene mucho menor efecto de formación de hueso en comparación con el producto recombinante. En este estudio se usó el modelo de oveja. Podría ser que la oveja como modelo no sea apropiada para Grafton u otros productos de DBM humana en comparación con otro producto de DBM como Collos que ha dado resultados de curación superiores en modelos de oveja y perro.

En este estudio un objetivo era comparar implante cerámico, que contiene el extracto de proteína ósea de reno, con autoinjerto. Los resultados mostraron que el autoinjerto no era mejor en la formación de hueso o la curación de defectos que el extracto de proteína ósea en estructura de TCP. Este era un resultado alentador al encontrar un método substitutivo para el tratamiento de autoinjerto que tiene limitaciones debido a que la cosecha de los injertos óseos puede llevar a complicaciones, tales como sangrado, dolor e infección. Los resultados previos con materiales de DBM apoyan nuestros resultados.

En conclusión, los gránulos de β -TCP en la matriz de PEG-GLY con ácido esteárico es un sistema estructural viable para el extracto de proteína ósea de reno pero aún se debe optimizar la cantidad proporcional de gránulos en la matriz. El planeado y ensayado dispositivo médico que incluye el extracto de proteína ósea de reno y la formulación de β -TCP en forma inyectable es la alternativa apropiada para el tratamiento de autoinjerto usado hoy en día.

Tabla 17. Los artículos de ensayo y grupos de estudio

Grupo	N	Extracto de proteína ósea	Estructura
Pasta 1	8	60 mg de extracto de proteína ósea de reno (BBS-Bioactive Bone Substitutes Ltd, Oulu, Finland) / jeringa de 3 cm ³	β -TCP cambioceramics a medida (Cambioceramics, Cam Bioceramics, Leiden, The Netherlands), gránulos esféricos de 300-500 μ m de 1,24 g/cm ³ de densidad combinados con matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG/GLY) (Clariant, Kemi Intressen, y Croda, Kemi Intressen) con ácido esteárico (Ácido esteárico 50, mezcla de ácidos grasos, que consiste principalmente en ácido esteárico y 40-60% de ácido palmítico, Fluka, Sigma-Aldrich)
Pasta 2	8	30 mg de extracto de proteína ósea de reno/ jeringa de 3 cm ³	β -TCP Cambioceramics, 300-500 μ m de 1,24 g/cm ³ de densidad combinado con matriz de PEG/GLY modificada con ácido esteárico.
Pasta 3	8	-	β -TCP Cambioceramics, 300-500 μ m de 1,24 g/cm ³ de densidad combinado con matriz de PEG/GLY modificada con ácido esteárico.
Pasta 4	7	60 mg de extracto de proteína ósea de reno/ jeringa de 3 cm ³	β -TCP Cerasorb M de Curasan (Cerasob® M Ortho, Curasan AG, Frankfurt, Germany), trozos de 500-1000 μ m de 0,61 g/cm ³ de densidad combinado con matriz de PEG/GLY modificada con ácido esteárico.
Pasta 5	8	60 mg de extracto de proteína ósea de reno/ jeringa de 3 cm ³	β -TCP Cerasorb de Curasan (Cerasob®, Curasan AG, Frankfurt, Germany), gránulos de 500-1000 μ m de 1,21-1,24 g/cm ³ de densidad combinado con matriz de PEG/GLY modificada con ácido esteárico.

Pasta 6	8	-	β -TCP Cerasorb M de Curasan, trozos de 500-1000 μm de 0,61-0,64 g/cm ³ de densidad combinado con matriz de PEG/GLY modificada con ácido esteárico.
Gránulo	7	-	β -TCP Cambioceramics, 300-500 μm de 1,24 g/cm ³ de densidad. La cantidad de gránulos era el doble comparado con la cantidad de gránulos en los grupos de pasta.
Autoinjerto	8	-	-
Grafton	7	DBM (pasta de matriz ósea desmineralizada Grafton Plus®, 1 cm ³ , Osteotech Inc., Eatontown, New Jersey, USA)	-
Defecto vacío	8	-	-

Formulaciones según continúa de la etapa de diálisis con citrato:

Se prepara un liofilizado liofilizando el precipitado obtenido de la etapa de diálisis con citrato usando lioprotectores apropiados:

- 5 Se prepara una disolución de excipientes en exceso que contiene tensioactivo (Polysorbat 20), lioprotector (Trehalosa), agente espesante (Glicina) y tampón (Manitol) en agua WFI. La disolución se esteriliza en autoclave. El contenido seco de proteína de la etapa de diálisis con citrato se analiza pesando y se añade una cantidad apropiada de la disolución de excipientes esterilizada. La mezcla se mezcla con un mezclador apropiado hasta que se forma una suspensión homogénea. La suspensión homogénea proteína-excipientes se dispensa en bandejas para liofilización o viales de dosis unitaria y se liofiliza subsecuentemente. El extracto de proteína liofilizada contiene entonces 0,35% en peso de Polysorbat, 0,97% de trehalosa, 4,1% de glicina, 10,9% de manitol y 83,7% de extracto de proteína.

La disolución de excipientes se ensayó y seleccionó usando un enfoque de Diseño de Experimentos (DoE) con los siguientes niveles de factor:

- 15 Tensioactivo: Polysorbat 20 o Polysorbat 80 (0,01-1,06%)

Lioprotector: trehalosa o sacarosa (0,2-2,3%)

Agente espesante: glicina o CMC (1,0-10%)

Tampón: manitol o histidina (3,2-23%)

Se han ensayado por lo menos cinco diferentes formulaciones con la composición de liofilizado seleccionada.

- 20 La Formulación 1 comprende el liofilizado anteriormente mencionado liofilizado en viales de dosis unitaria. El liofilizado se reconstituye con disolución salina después de lo cual se puede inyectar a través de una aguja.

La Formulación 2 comprende el liofilizado anteriormente mencionado liofilizado en viales de dosis unitaria. El liofilizado se reconstituye con disolución salina después de lo cual se puede impregnar en varias estructuras. Los ejemplos de estructuras apropiadas son discos de TCP o TCP/HAP porosos o composites poliméricos porosos.

- 25 La Formulación 3 comprende el liofilizado anteriormente mencionado liofilizado en viales de dosis unitaria. El liofilizado se mezcla con sal de calcio (sulfato de calcio, fosfato de calcio) para formar una pasta/masilla moldeable. La pasta/masilla se puede dar forma a mano o moldear en forma de discos o pelets apropiados.

Material para dosis de 60 mg.

1. Vial [1] – 60 mg de liofilizado
2. Vial [2] – 1 g de disolución salina
3. Vial [3] – sulfato de calcio hemihidrato
4. Vial [4] – bol de mezcla
5. Disco moldeado

6. Espátula

Instrucciones para uso:

1. abrir el vial [1] de 60 mg de formulación liofilizada y añadir 1 g de disolución [2] salina. Mezclar hasta que se forma una suspensión homogénea.

5 2. Dispensar los 2 g de vial [1] de CS hemihidrato en el bol [4] de mezcla y añadir la suspensión del vial [2]

3. Mezclar durante 60 segundos usando la espátula [6]

4. Se puede formar una pasta en 5 minutos, y se endurece en 5-10 minutos.

5. Llena el molde [5] de disco con la pasta y deja endurecer

6. Las estructuras están listas para implantar cuando se retiran del molde después de 60 min

10 La Formulación 4 comprende el liofilizado anteriormente mencionado liofilizado en bandejas (lyoguards). El liofilizado se mezcla con sulfato de calcio y ácido esteárico y se comprime en forma de pelets apropiados.

Fabricación de pelets de sulfato de calcio-ácido esteárico

Los pelets de CS/ácido esteárico se fabrican en la habitación limpia

15 Primero se mezcla un exceso de sulfato de calcio hemihidrato con agua WFI y se extruye de modo que se forme una tira de sulfato de calcio dihidrato (yeso). Después de 60 minutos cuando se endurece, la(s) tira(s) se corta(n) en forma de pelets, y a continuación se granula en forma de pequeños gránulos el día siguiente.

Una cantidad en exceso de ácido esteárico se criba a través de un tamiz de 1 mm para retirar las partículas más grandes.

El contenido de un vial liofilizado se mezcla con 1,5 g de sulfato de calcio y 0,5 g de ácido esteárico en un pequeño bol.

20 Se forman pelets de 5 mm de diámetro pesando 100 mg de la mezcla de polvo en la prensa de hacer comprimidos, y a continuación se prensa durante 10-15 segundos. Los pelets se introducen en un vial de vidrio y se etiquetan.

La formulación 5 comprende una pasta inyectable que contiene el liofilizado anteriormente mencionado, y suministrado en un sistema de jeringa apropiado. La pasta se compone de polietilenglicol (PEG 2000), glicerol y ácido esteárico, junto con gránulos esféricos de fosfato de tricalcio (TCP).

25 Se prepara una pasta pesando 37% de PEG 2000, 59% de glicerina y 3,5% de ácido esteárico en un mezclador de pasta. La mezcla se calienta por encima del punto de fusión del PEG y ácido esteárico (60-70°C). La mezcla se deja enfriar lentamente durante la mezcla continua hasta que se ha formado una pasta a temperatura ambiente. La cantidad apropiada del anteriormente mencionado liofilizado y gránulos de TCP se añaden y mezclan hasta que es homogéneo. La pasta se introduce en las jeringas y se envasa en lámina de aluminio. El producto final contiene 1,27% de extracto de proteína, 0,01% de Tween, 0,01% de trehalosa, 0,06% de glicina, 0,16% de manitol, 28,9% de TCP, 41,2% de glicerol, 26,0% de PEG 2000 y 2,43% de ácido esteárico.

30 La formulación 6 comprende pelets o gránulos de superficie revestida. El extracto de tejido animal se mezcla con agentes formadores de película y a continuación se reviste por pulverización sobre los pelets.

Formación de pelets de yeso

35 Material (por molde):

10 g de sulfato de calcio hemihidrato (beta): Sigma-Aldrich

0,5 g (5%) de ácido esteárico: Merck, Parateck

5 ml de agua WFI. Fresenius Kabi (One-Med)

Preparación (6 moldes)

40 Se mezcla sulfato de calcio (61 g) y ácido esteárico (3,0 g) como sigue: se presiona materia prima a través de un tamiz de 1 mm por turnos en pequeñas cantidades para mezclarlo por capas. Después de esto se mezclan con una cuchara hasta una mezcla homogénea.

45 Se añade sulfato de calcio-ácido esteárico (10,5 g) a agua WFI (5 ml) y se mezcla hasta que se obtiene una mezcla uniforme (alrededor de 30 segundos). La mezcla se moldea en un molde de silicona y se deja endurecer bajo una membrana de plástico. La mezcla es moldeable durante alrededor de 5 minutos y los pelets moldeados se pueden

retirar del molde después de alrededor de 60 minutos.

El polvo y los restos más grandes de moldeo formados durante el procedimiento de moldeo se retiran cribando. El endurecimiento final ocurre durante 24 horas (bajo una lámina protectora).

- 5 Los pelets secos se envasan en bolsas Minigrip en forma de parche (2 x 67 g) y se almacenan en una habitación fría al secar el material.

Revestimiento de pelets de yeso

Los materiales usados en el revestimiento se listan en las Tablas 18-20

Tabla 18: Composición

Material	Por dosis (2 g)
Extracto de proteína	60 mg
Tween 20	0,44 mg
CMC	13,2 mg
PEG 400	2,20 mg
Pelet de yeso	1921 mg

- 10 Tabla 19: Disolución de revestimiento (contenido seco de la suspensión pulverizada: 3%)

Material	Cantidad
CMC	1,63 g
PEG 400	0,27 g
TWEEN 20	0,5 g
Agua WFI	100 g
TWEEN-20/agua	10 g
Agua WFI	290 g

Tabla 20: Disolución de revestimiento y la cantidad de pelets por lote:

Material	Cantidad	Proveedor/calidad
Pelet de yeso	67 g	BBS Oy
Extracto de proteína	7 g	BBS OY, YHD 200809
Disolución de revestimiento	146 g	BBS OY

- 15 Se pesan 7 g de extracto de proteína para el recipiente de mezcla y se añaden 146 g de disolución de excipiente. La mezcla se mezcla hasta que es visualmente homogénea. La suspensión se mantiene homogénea con agitador magnético todo el tiempo durante el revestimiento.

- 20 Se carga un granulador de lecho fluidizado con 67 g de pelets de sulfato de calcio (3x3 mm). Los pelets se fluidizan primero durante 30 segundos para retirar el polvo de yeso extra. El revestimiento comienza arrancando la bomba de alimentación de la disolución de revestimiento. Durante el revestimiento se monitoriza la alimentación de la disolución de revestimiento, la posición de la cabeza del inyector, la flotación de los pelets y su adhesión a las paredes de la cámara.

La adhesión de los pelets a las paredes de la cámara se previene pulsando la alimentación para dejar secar los pelets (por ejemplo, en ciclos de 15 segundos)

- 25 El revestimiento se detiene cuando toda la disolución de revestimiento se ha pulverizado y la humedad extra se ha evaporado de la superficie de los pelets, es decir, la humedad y la temperatura del aire saliente se han vuelto estables. No se recomienda demasiada fluidización porque los pelets comenzarán a triturarse y se puede erosionar la proteína de la superficie.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de proteína ósea obtenida por un método que comprende:
 - a) desmineralizar un hueso y extraer la matriz ósea con el disolvente hidrocloreuro de guanidina para obtener un extracto de proteína ósea,
 - 5 b) filtrar el extracto con un microfiltro con un tamaño de corte en el intervalo de 0,1-10 μm (valor micrométrico nominal) suficiente para retirar grandes partículas y material no proteínico pero permitir que pasen las proteínas,
 - c) filtrar la fracción no retenida con un ultrafiltro de cartucho que tiene un tamaño de corte de alrededor de 5-10 kDa para recuperar la preparación de proteína ósea,
 en la que la preparación de proteína ósea obtenida se incorpora en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY).
- 10 2. La preparación de proteína ósea de la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que el tamaño de corte de la etapa b) es de alrededor de 0,1-0,22 μm o de alrededor de 1000 kDa.
3. La preparación de proteína ósea de la reivindicación 1 o 2, caracterizada por el hecho de que la preparación de proteína ósea se dializa para concentrarla y purificarla adicionalmente, tal como dializada con agua o con disolución de citrato.
- 15 4. La preparación de proteína ósea de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que el hueso es hueso de mamífero, tal como hueso de reno.
5. La preparación de proteína ósea de la reivindicación 4, caracterizada por el hecho de que el hueso es hueso de asta o hueso largo.
- 20 6. Una preparación de proteína ósea que contiene proteína Gla de la matriz, SPP-24 (fosfoproteína secretada), BMP-2, BMP-7 y TGF-beta 1 en cantidades sustanciales suficientes para proporcionar un efecto fisiológico, caracterizada por el hecho de que se incorpora en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG-GLY).
7. La preparación de proteína ósea de la reivindicación 6, caracterizada por el hecho de que contiene por lo menos uno de los siguientes: biglicano, trombina, lamina A/C, vimentina, condroadherina, proteína de matriz extracelular 22 K, lisil oxidasa, osteonectina, colágeno o dermatopontina en cantidades sustanciales para
 - 25 proporcionar un efecto fisiológico.
8. La preparación de proteína ósea de la reivindicación 6 o 7, caracterizada por el hecho de que es la preparación de proteína ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. La preparación de proteína ósea de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que la preparación de proteína ósea está en una forma de un liofilizado.
- 30 10. Un gránulo, pelet, disco, o bloque que comprende una preparación de proteína ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. El gránulo, pelet, disco o bloque de la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que la preparación de proteína ósea es un revestimiento sobre dicho pelet, disco, bloque o gránulo.
- 35 12. El gránulo de la reivindicación 10 u 11, caracterizado por el hecho de que el gránulo es un gránulo de β -fosfato de tricalcio (TCP).
13. El gránulo de la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que el gránulo es un gránulo de sulfato de calcio (CS).
14. El gránulo de la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que el gránulo es un gránulo de hidroxiapatito (HAP).
- 40 15. El gránulo de la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que el gránulo es un gránulo de HAP/TCP/CS, preferentemente en una relación de alrededor de 60:30:10 (en peso).
16. El gránulo de cualquiera de las reivindicaciones 10-15, caracterizado por el hecho de que el gránulo contiene ácido esteárico.
- 45 17. El gránulo de la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que la preparación de proteína ósea de reno está en una matriz de polietilenglicol/glicerol (PEG/GLY) que contiene ácido esteárico comprendido en gránulos de β -fosfato de tricalcio (TCP).
18. Una pasta o una masilla que comprende la preparación de proteína ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el gránulo de cualquiera de las reivindicaciones 10-17.

19. Un dispositivo osteogénico, tal como implante óseo, que contiene la preparación de proteína ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el gránulo de cualquiera de las reivindicaciones 10-17.
20. La preparación de proteína ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el gránulo de cualquiera de las reivindicaciones 10-17 para uso como medicamento.
- 5 21. La preparación de proteína ósea de la reivindicación 20 para uso como medicamento para tratar trastornos relacionados con defectos óseos o de cartílago en la que se desea su regeneración, reparación o crecimiento.

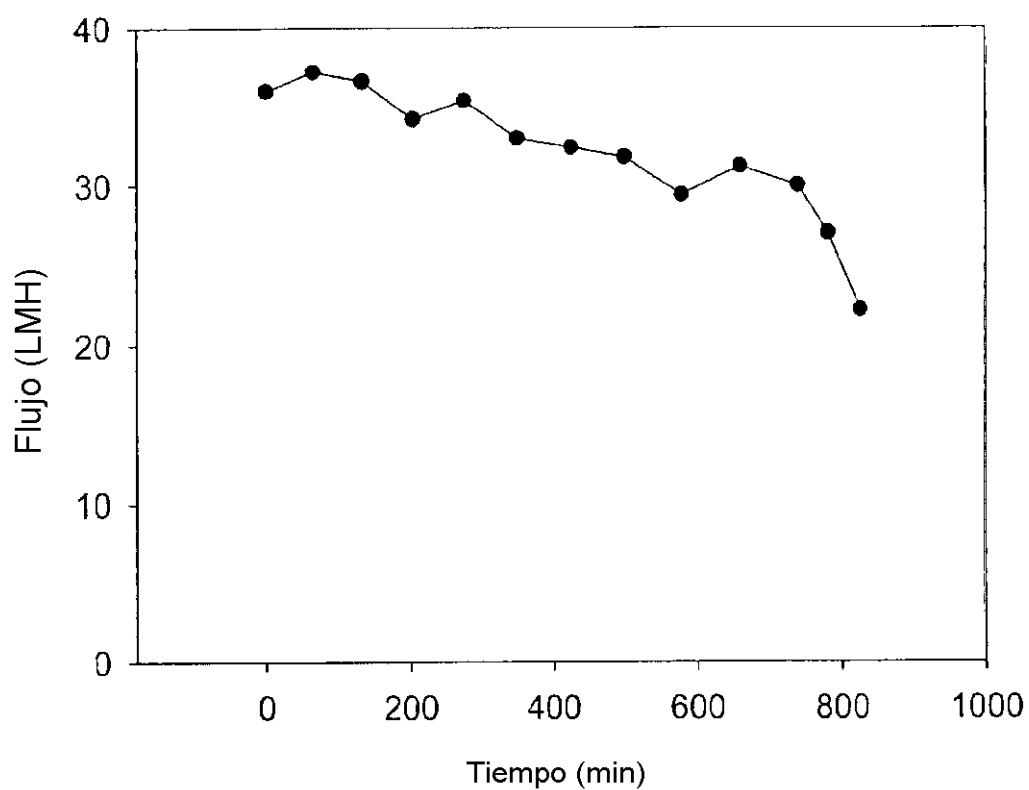


Fig. 1

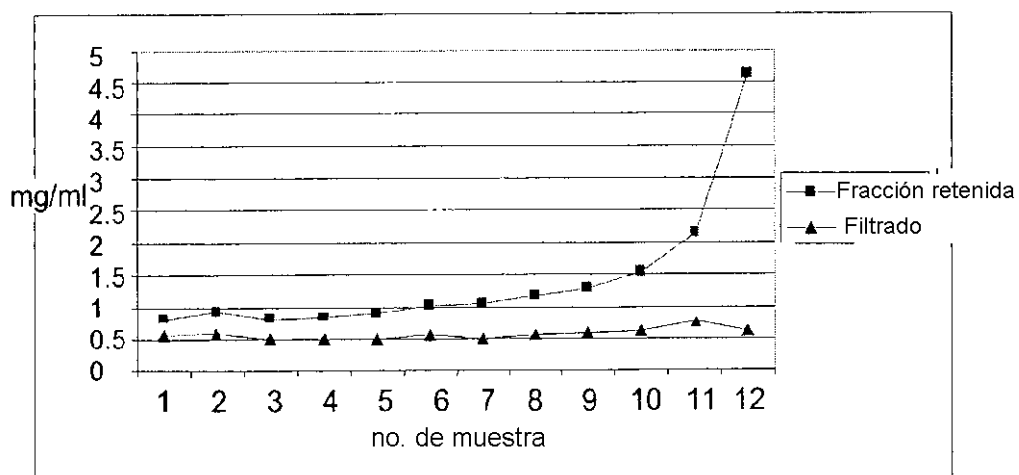


Fig. 2

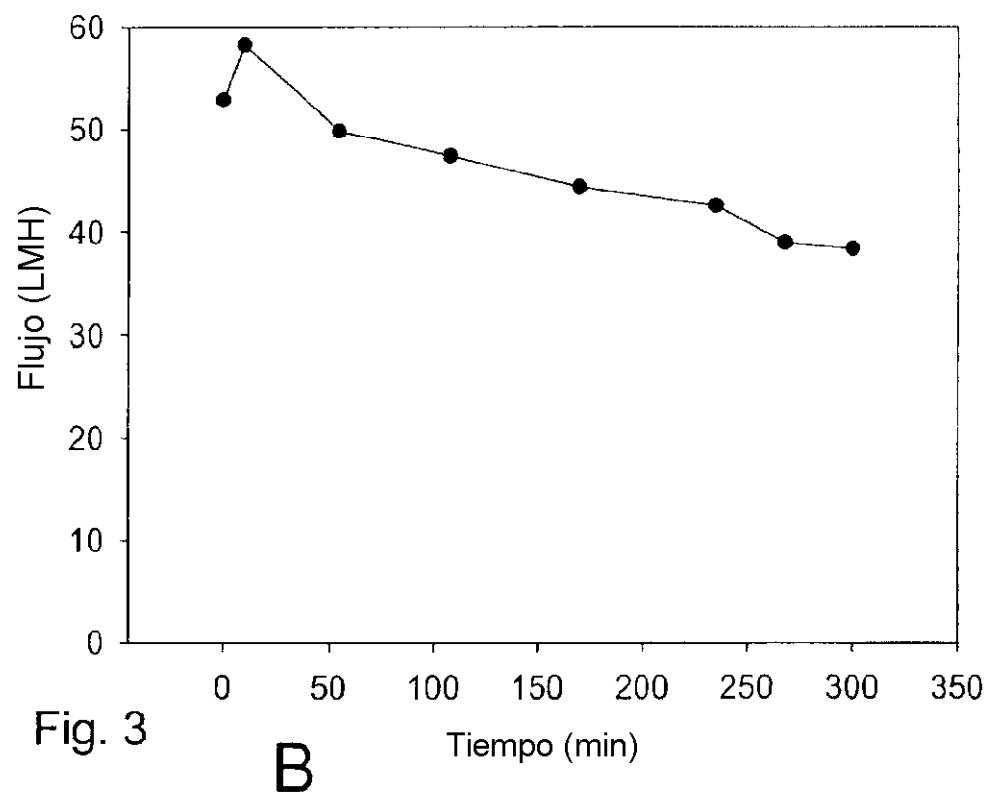
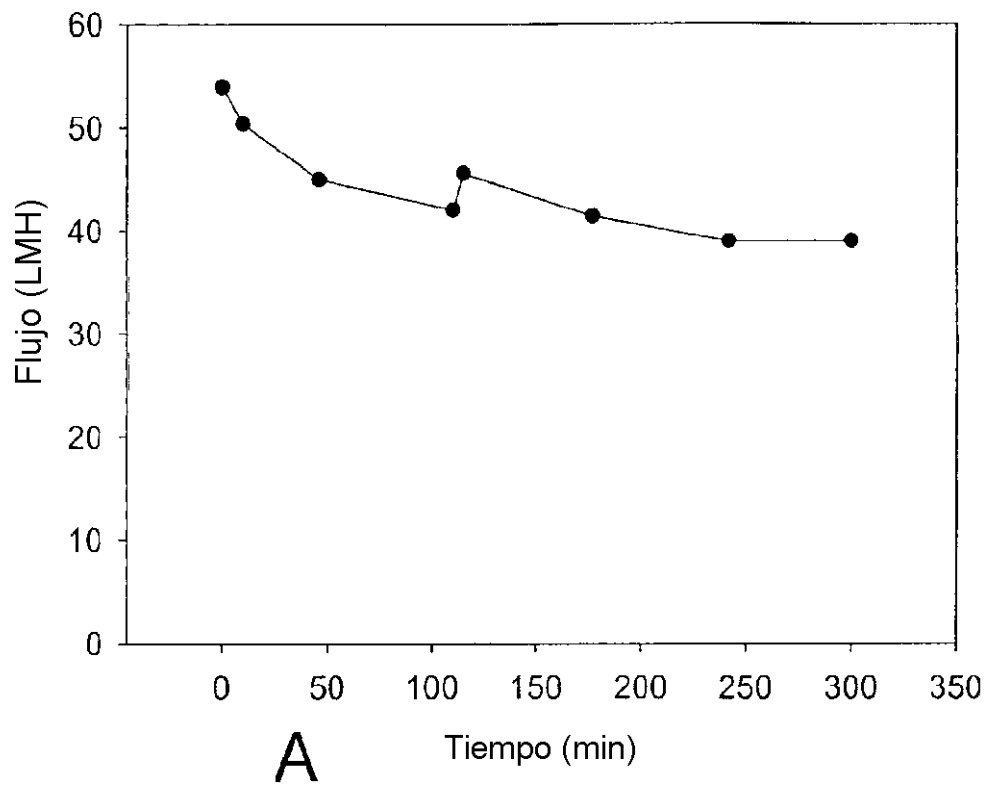
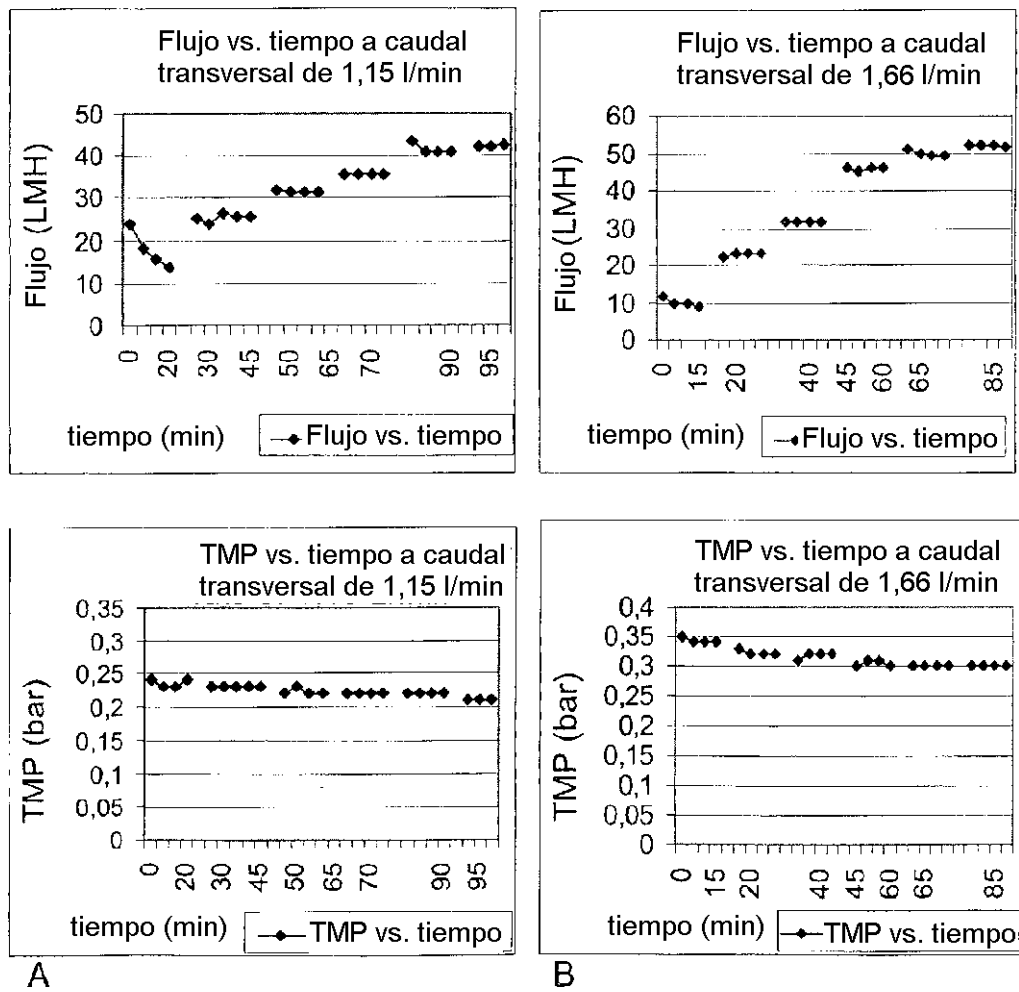


Fig. 3



Fig. 4



A

B

Fig. 5

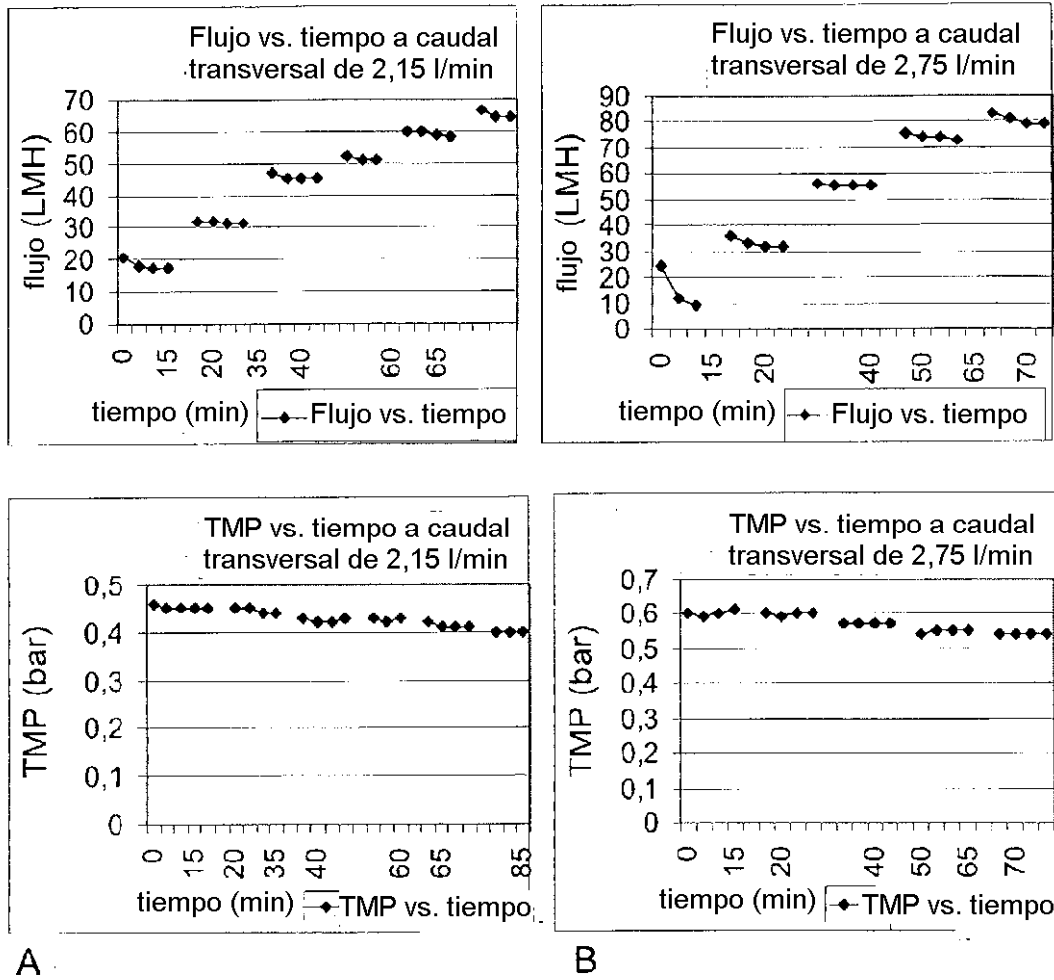
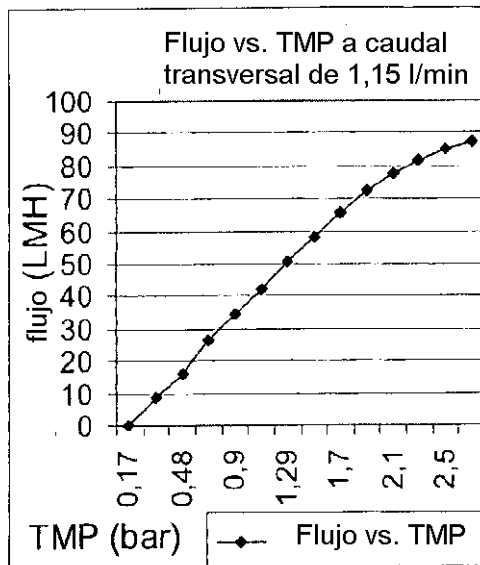
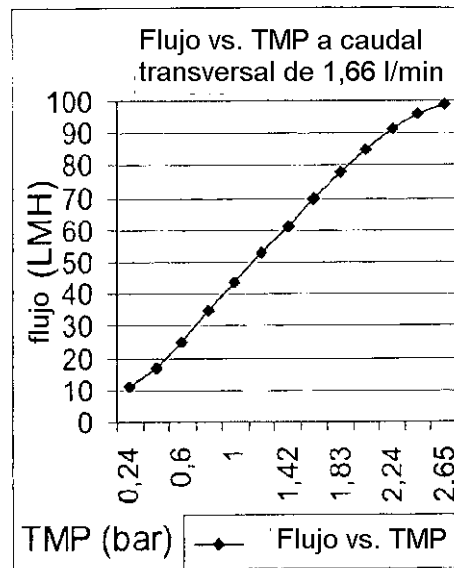


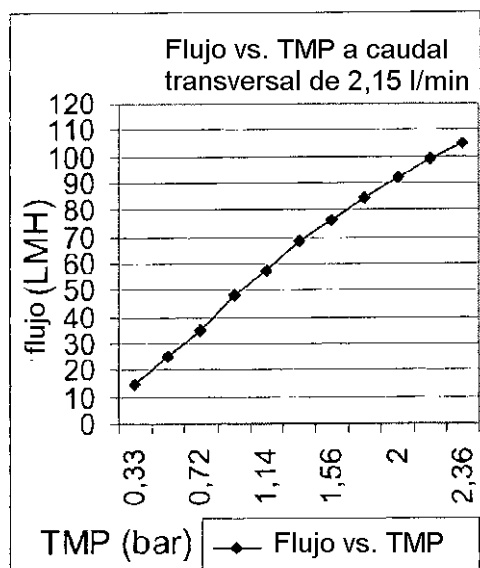
Fig. 6



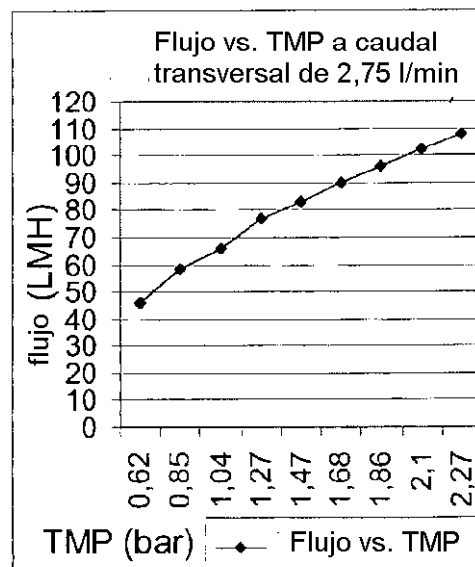
A.



B.



C.



D.

Fig. 7

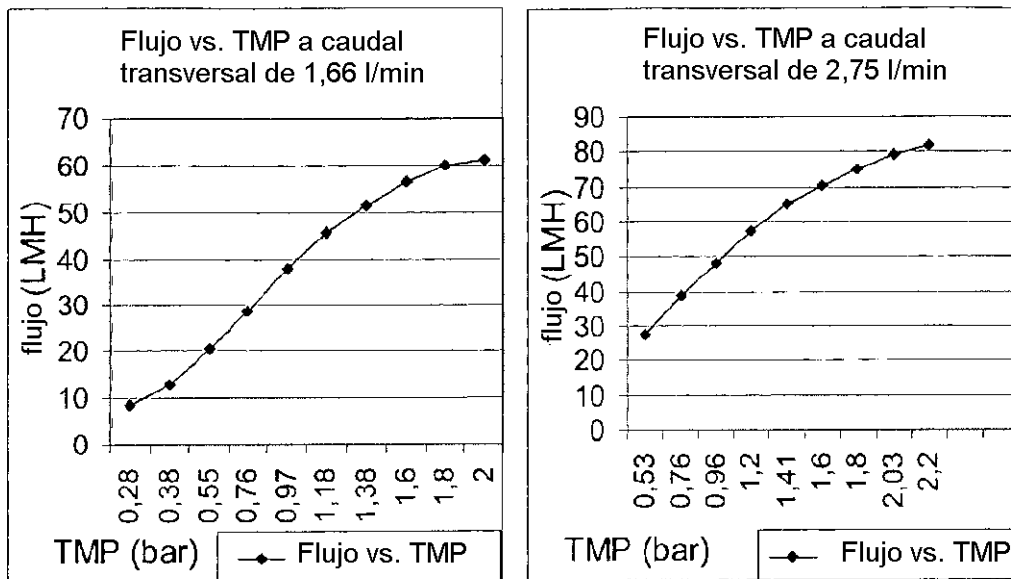


Fig. 8

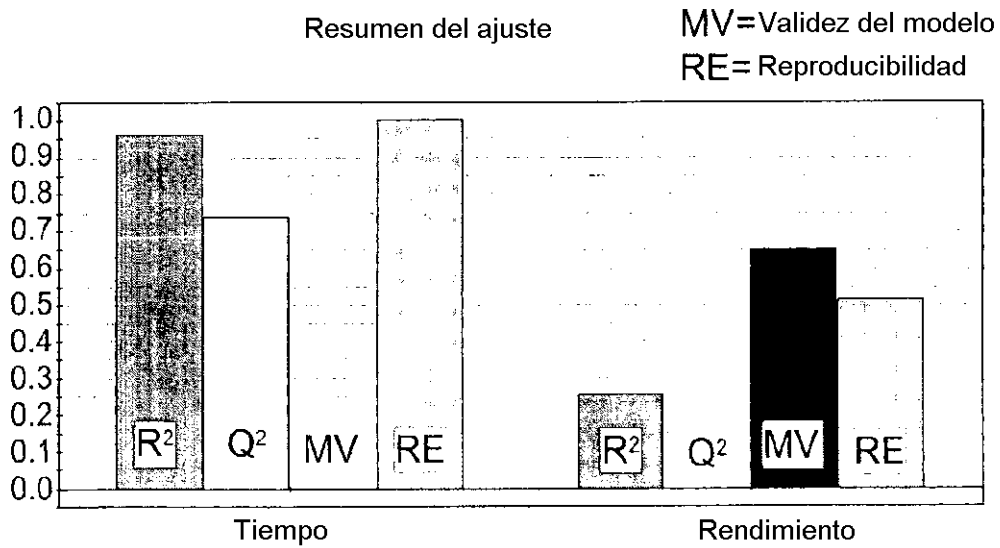


Fig. 9

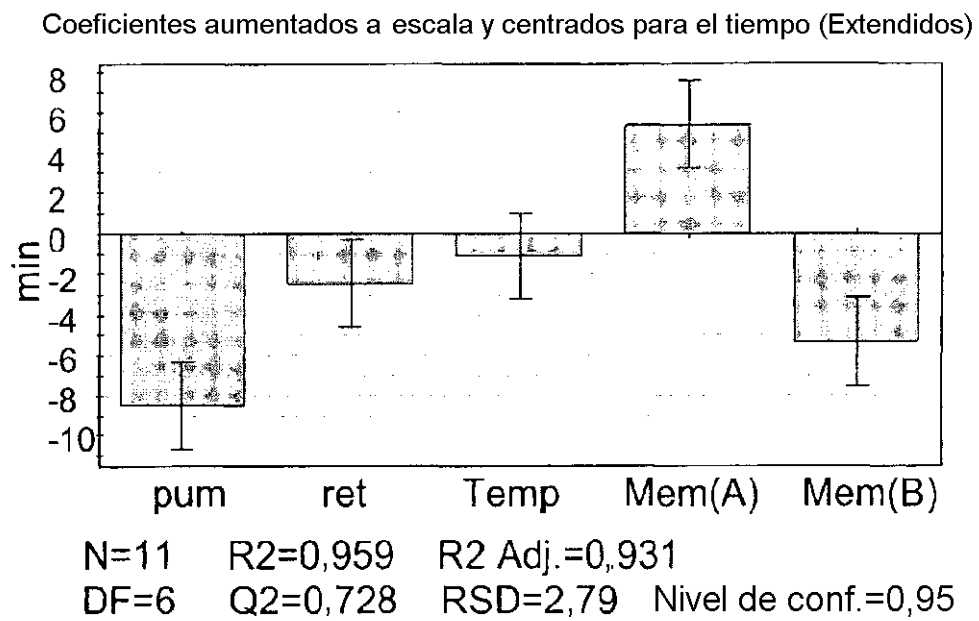


Fig. 10

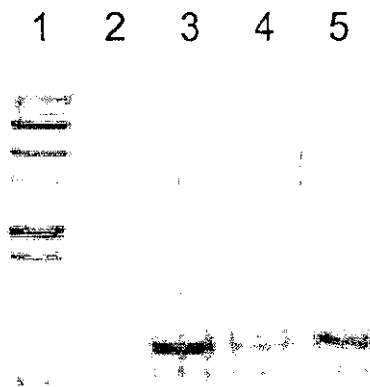


Fig. 11

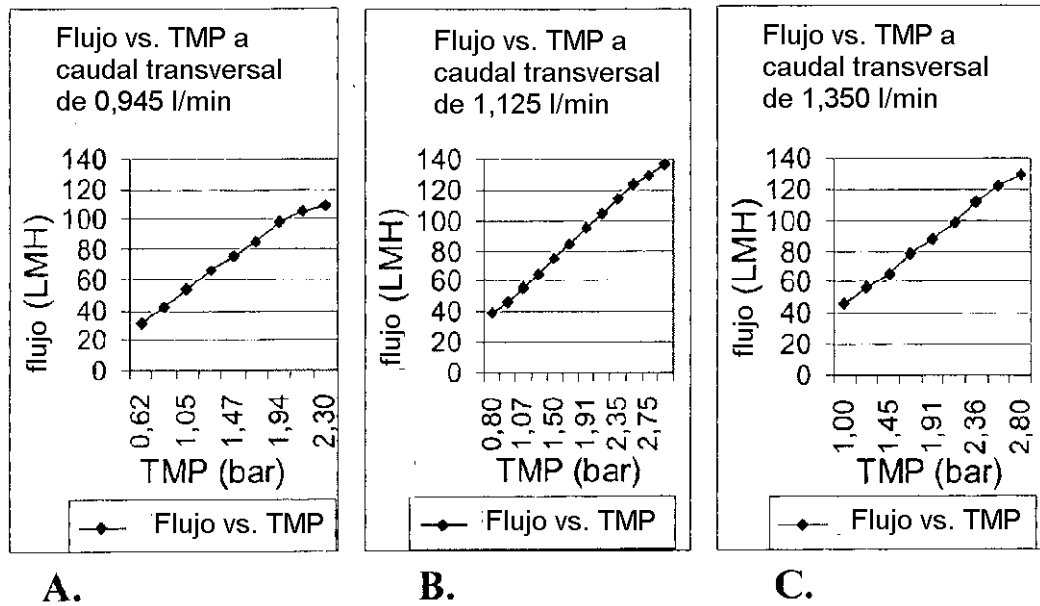


Fig. 12

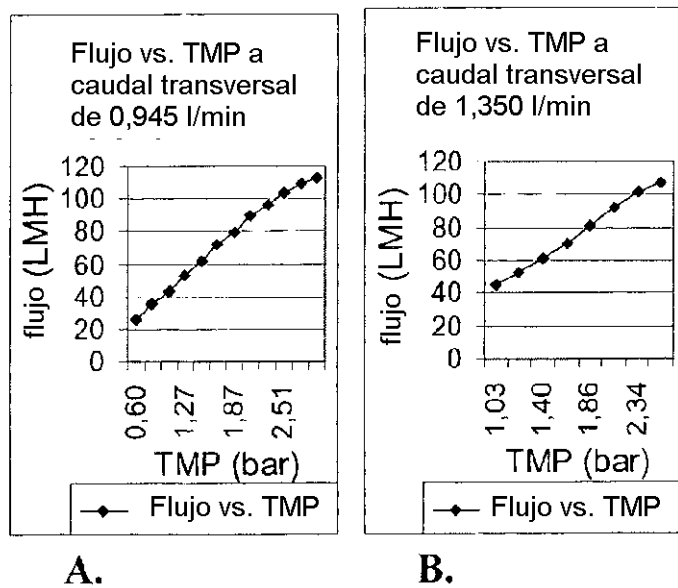


Fig. 13

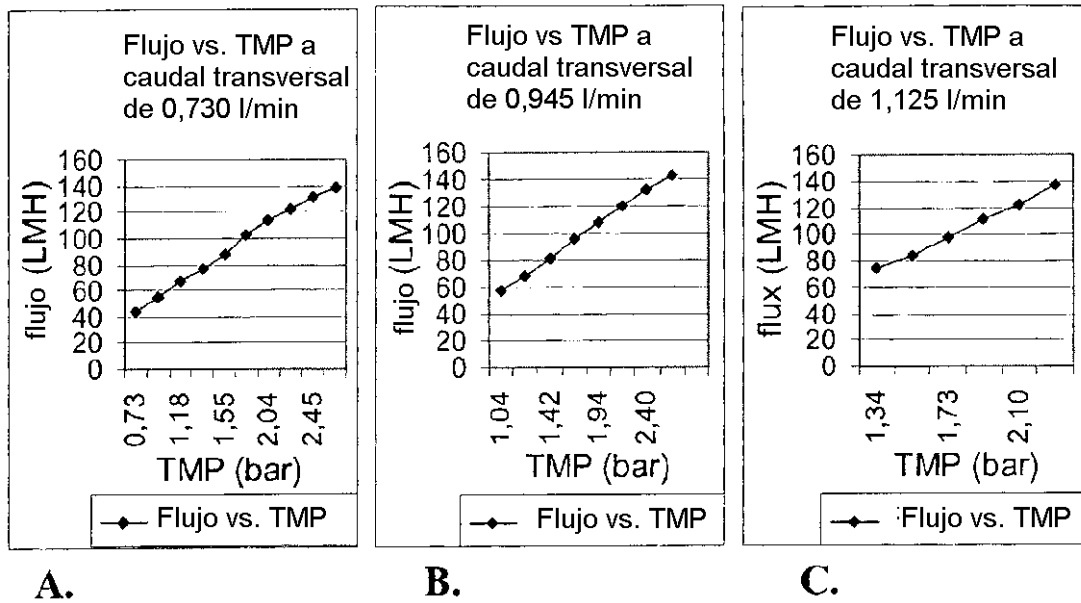


Fig. 14

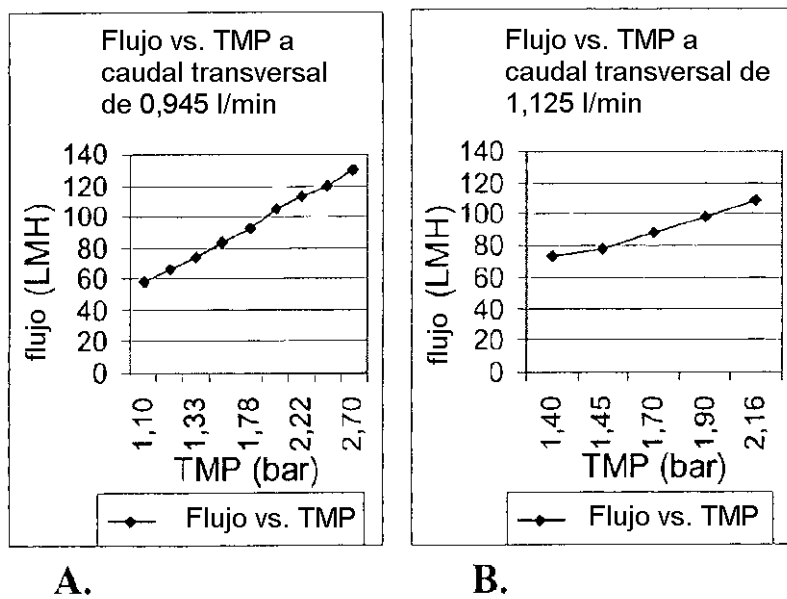


Fig. 15

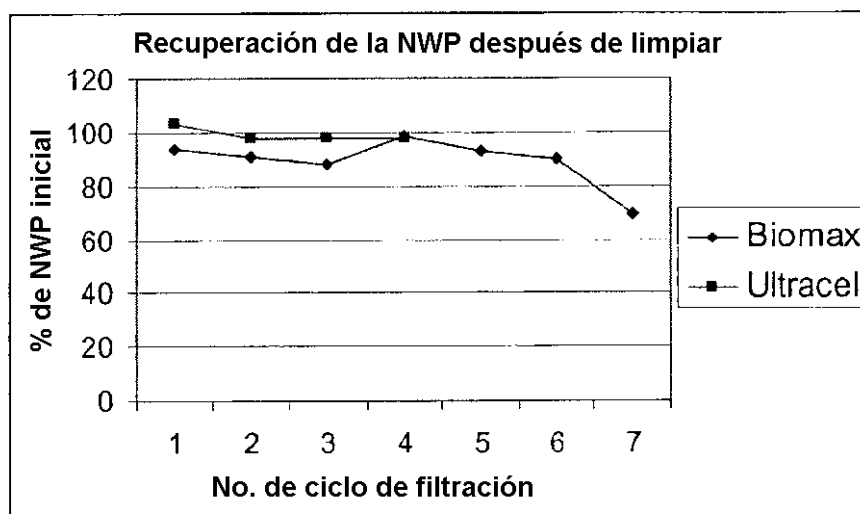


Fig. 16

Fabricación a pequeña escala 30 kg

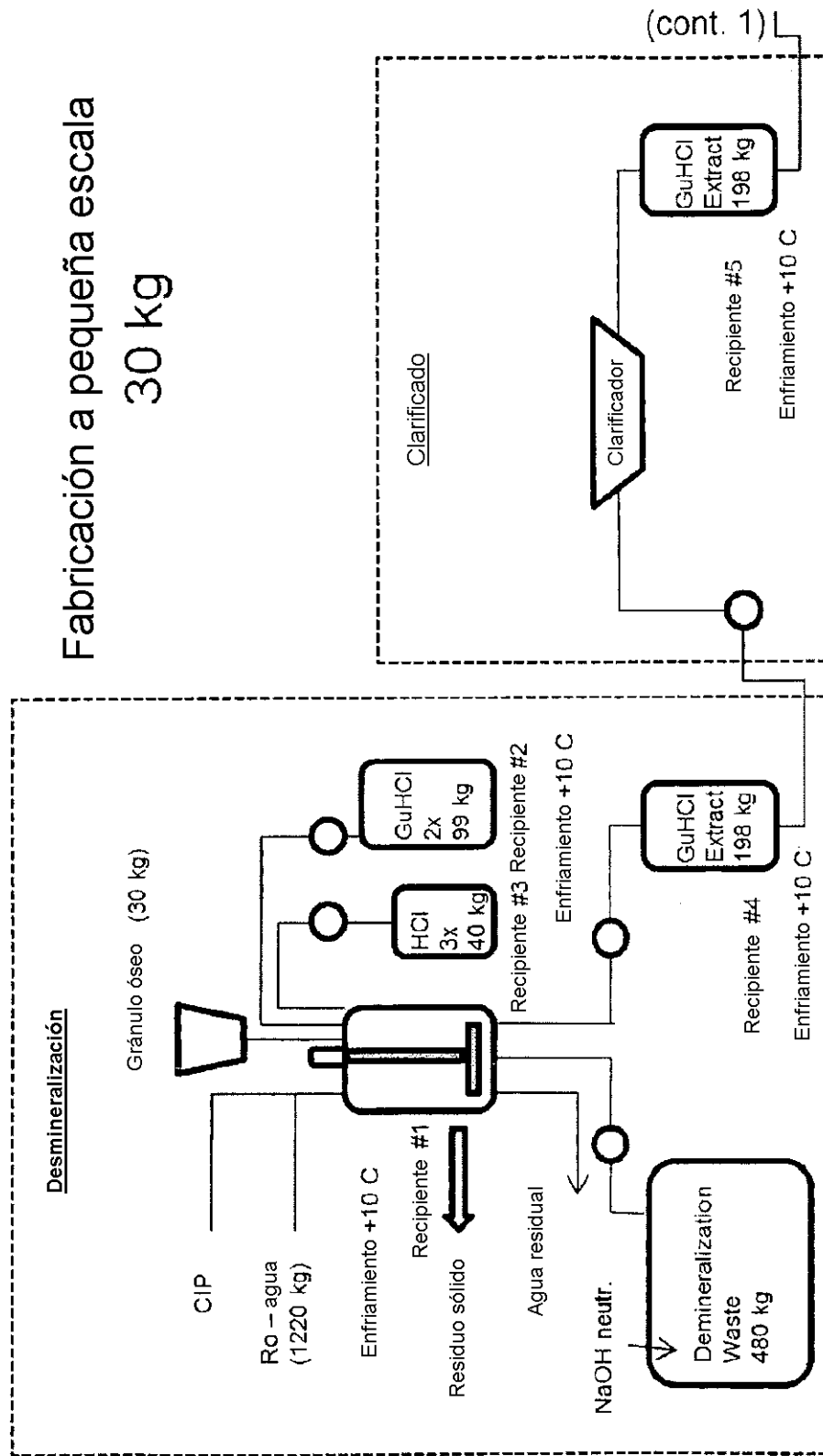


Fig. 17

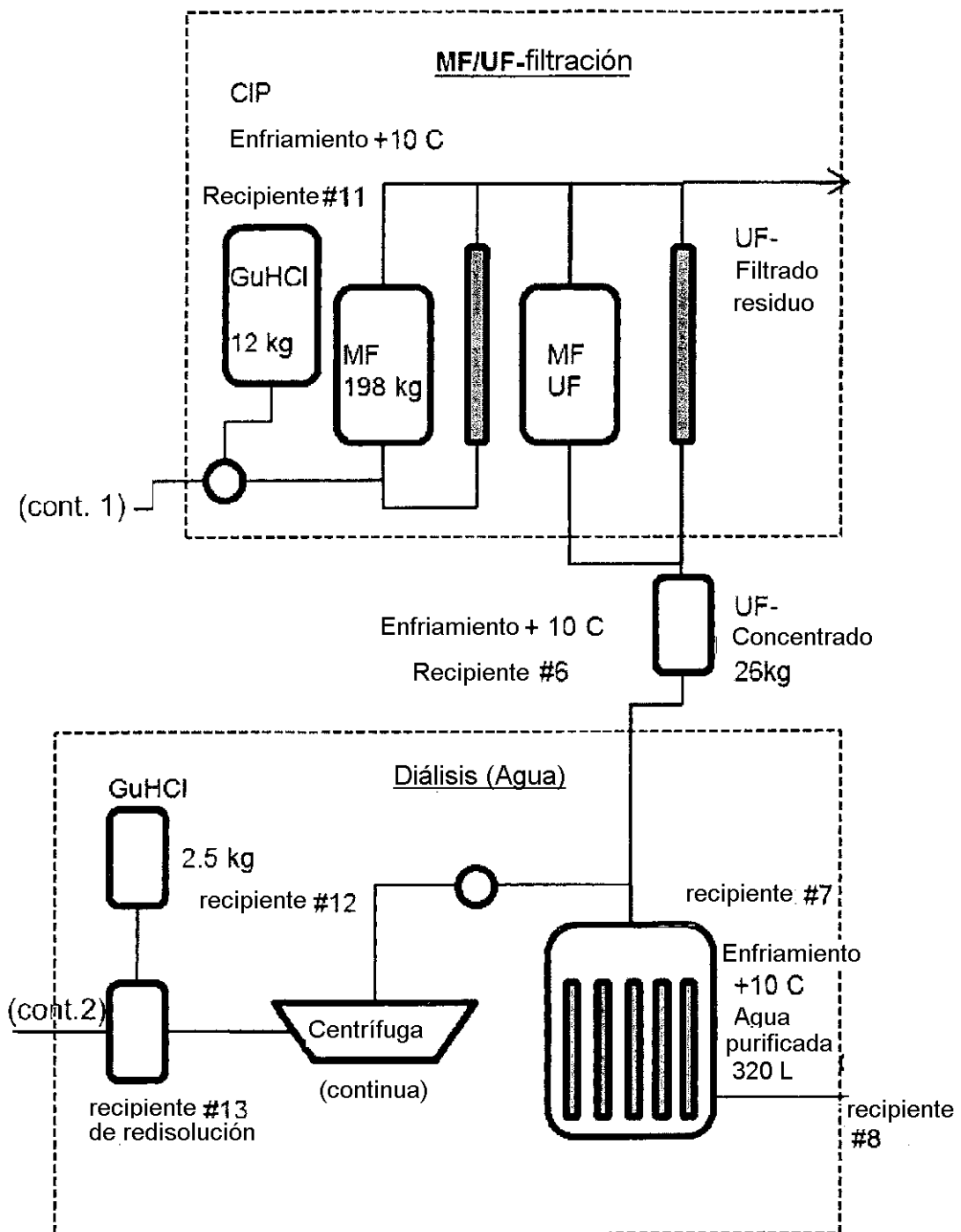


Fig. 17 cont.

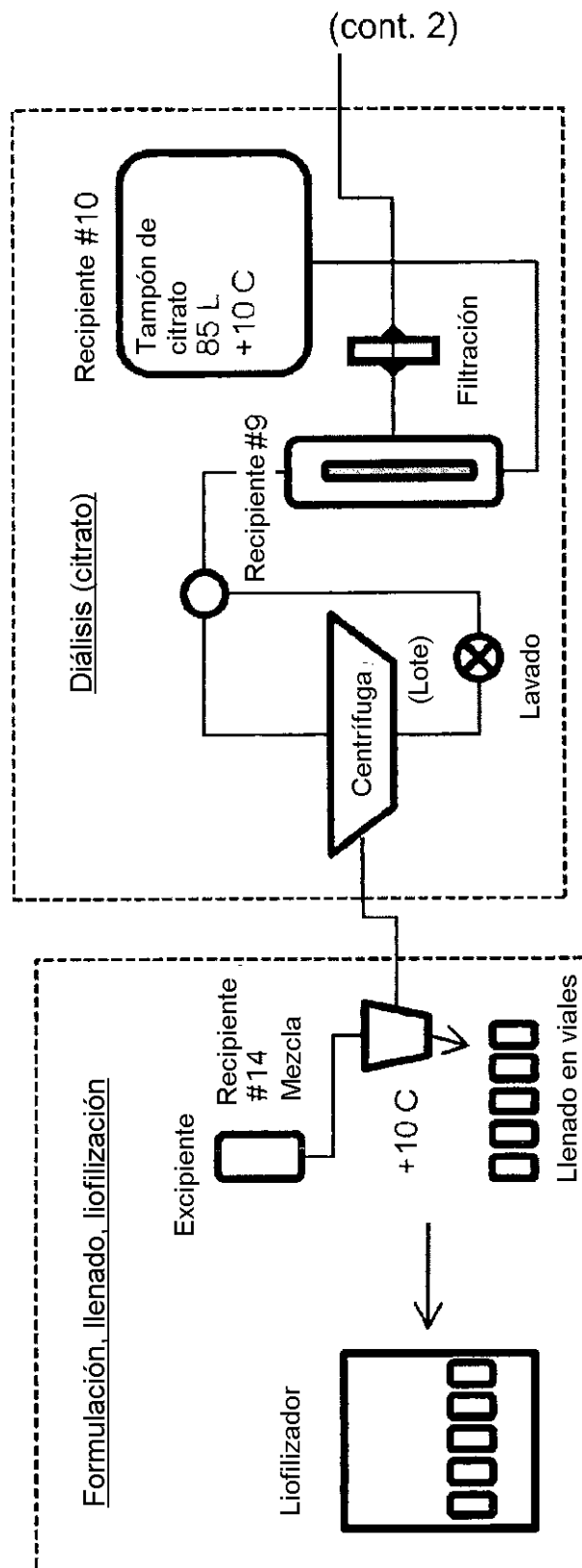


Fig. 17 cont.

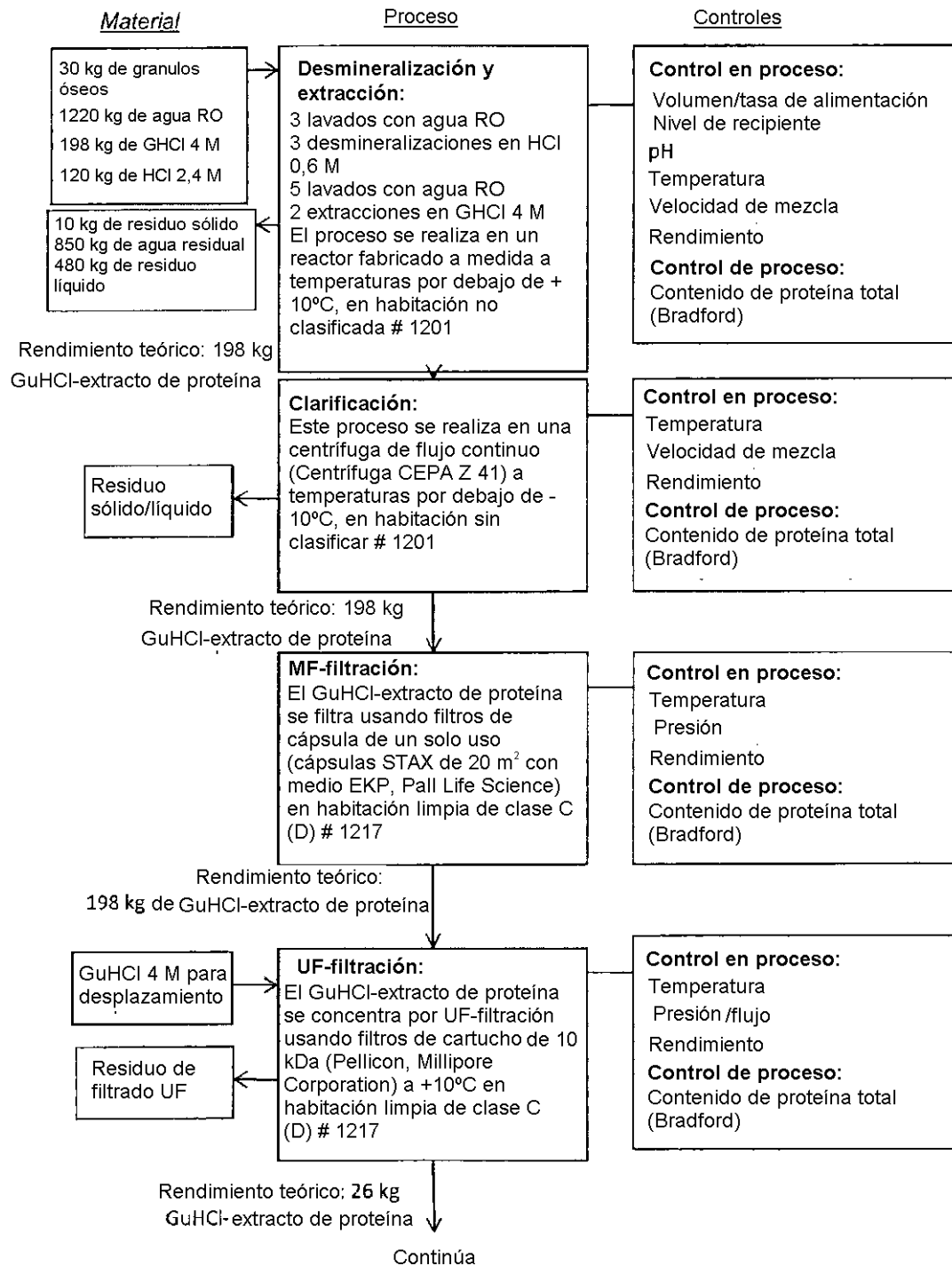


Fig. 18

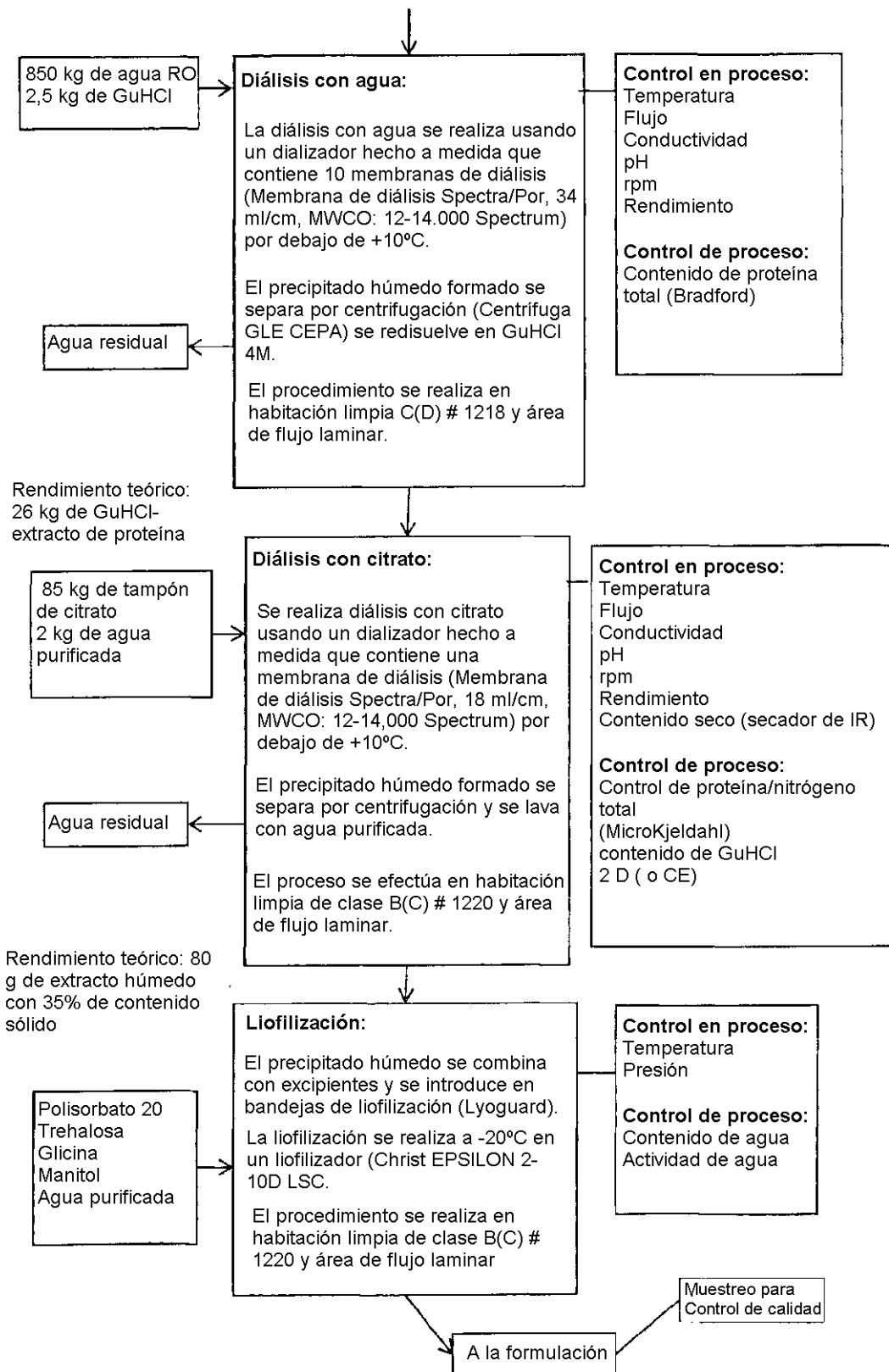


Fig. 18 continuación

Fig. 19

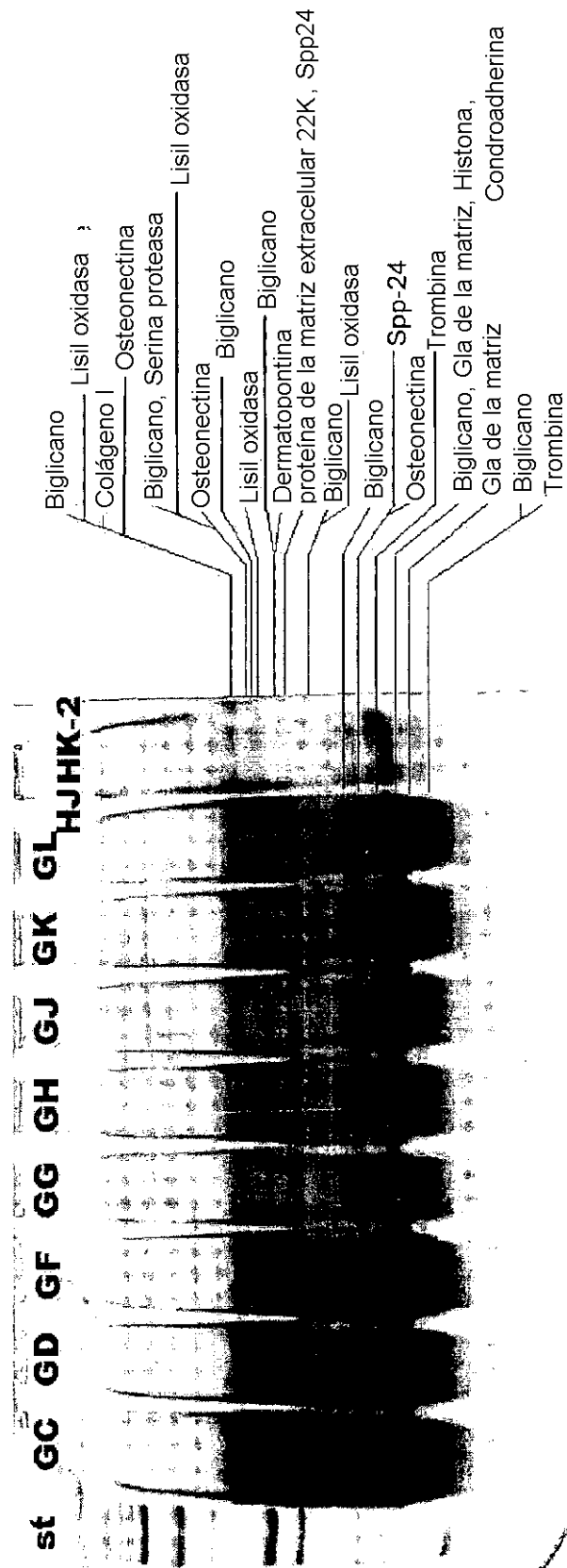
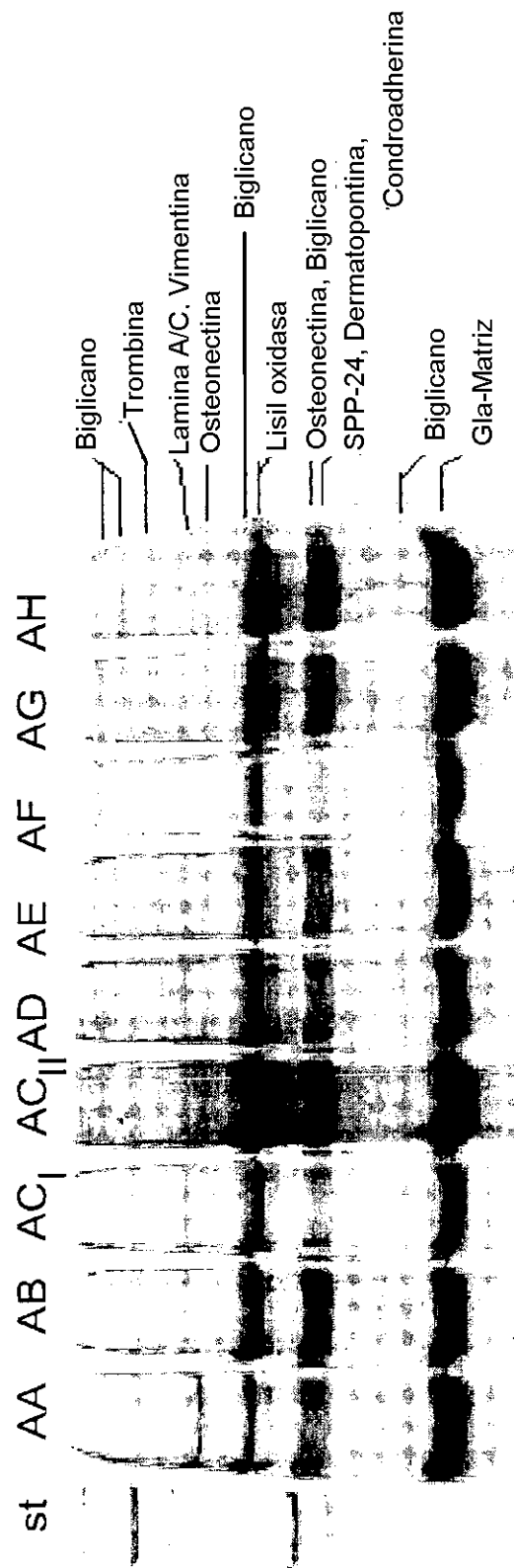


Fig. 20



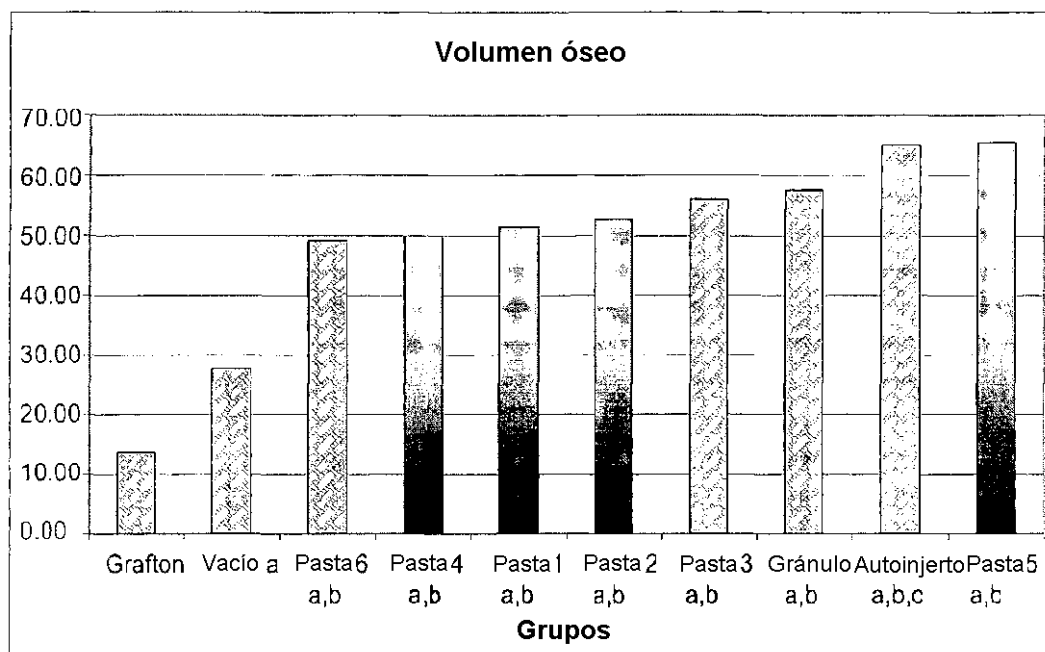


Fig. 21

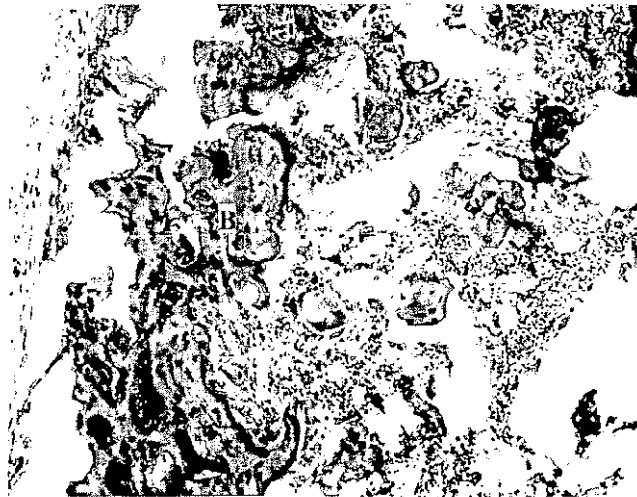


Fig. 22



Fig. 23A

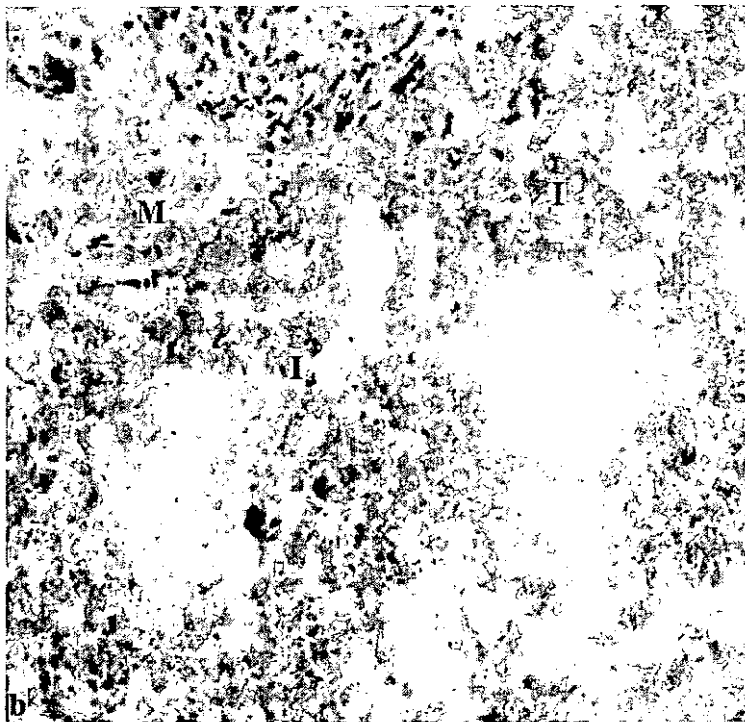


Fig. 23B



Fig. 23C

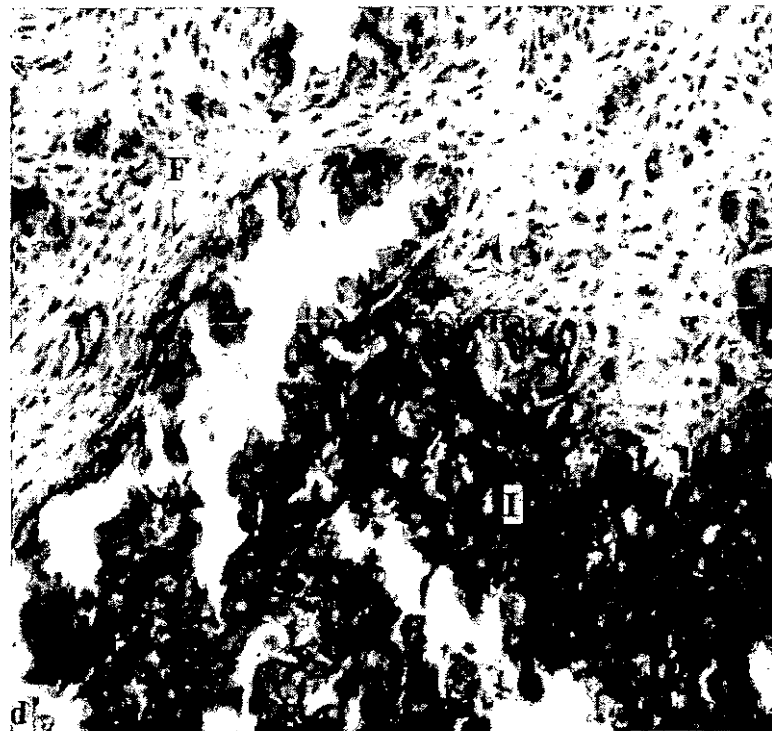


Fig. 23D



Fig. 23E



Fig. 23F

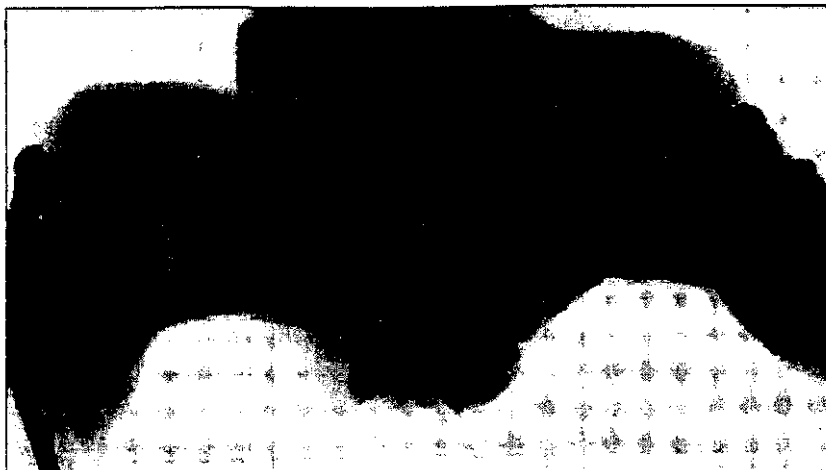


Fig. 24A

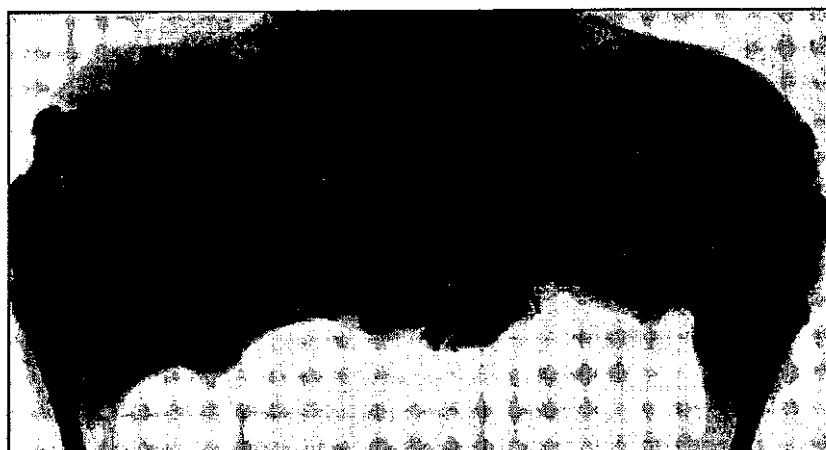


Fig. 24B

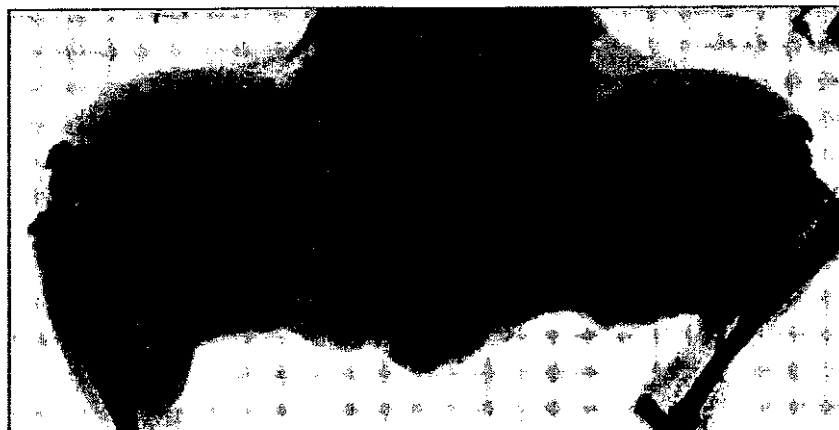


Fig. 24C

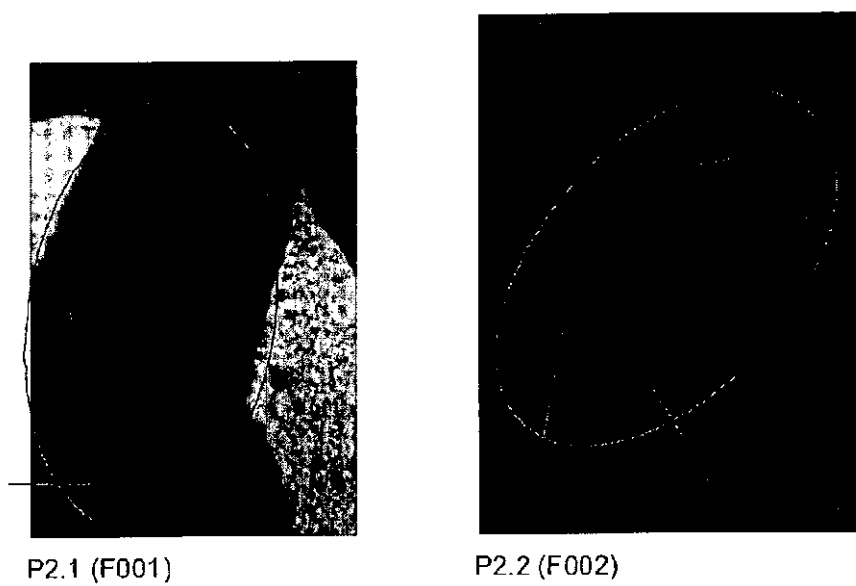


Fig. 25

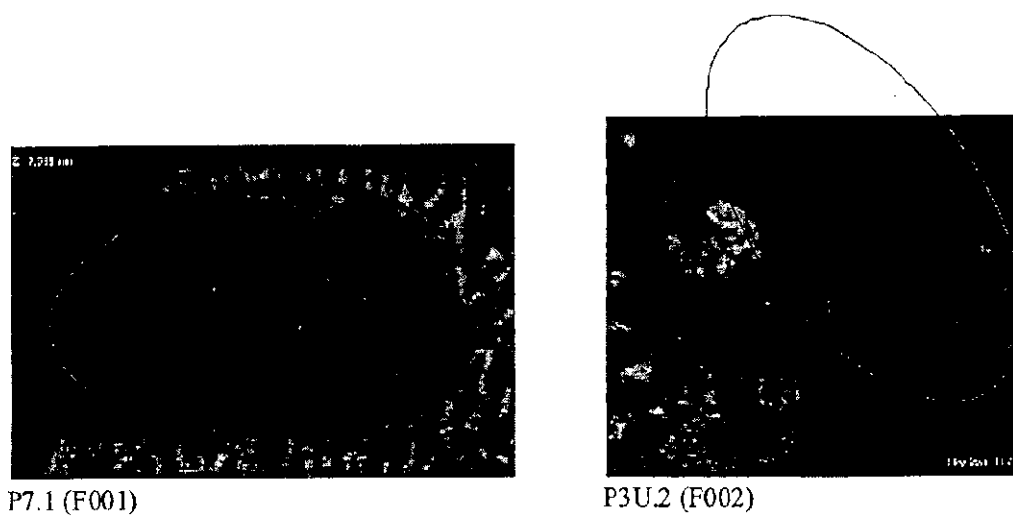
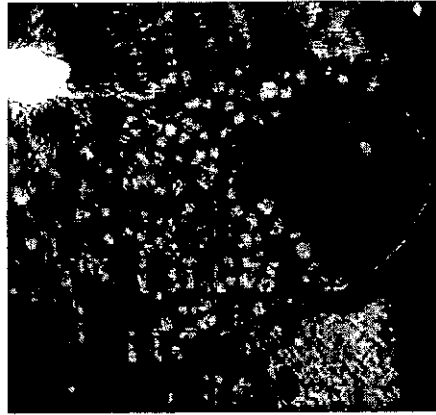
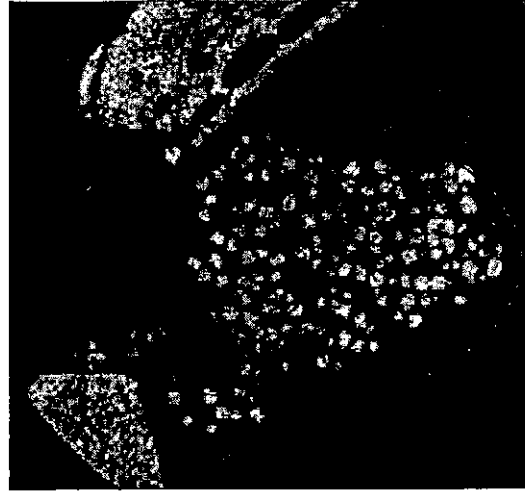


Fig. 26

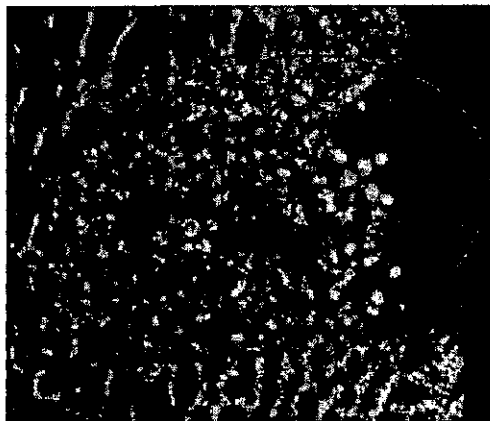


P2.3 (F003)



P2.4 (F004)

Fig. 27

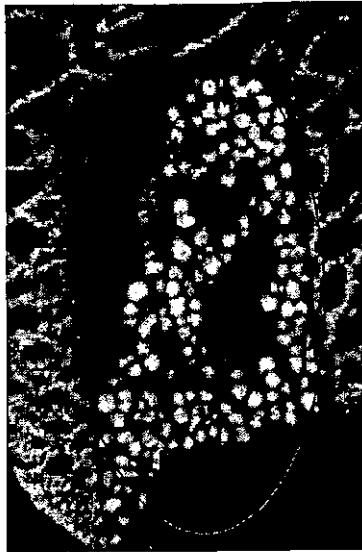


P7.3 (F003)



P7.4 (F004)

Fig. 28



P5.1 (F005)

Fig. 29



P9.1 (F005)



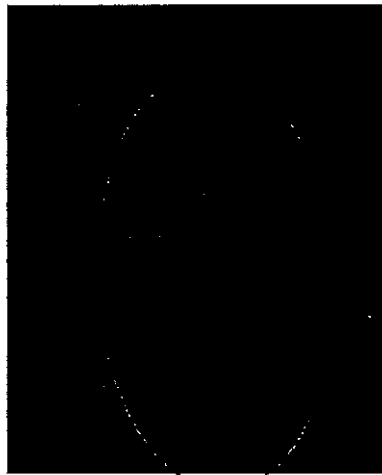
P10.3 (F006)

Fig. 30



P5.2 (Vacío)

Fig. 31



P10.4 (Vacío)

Fig. 32

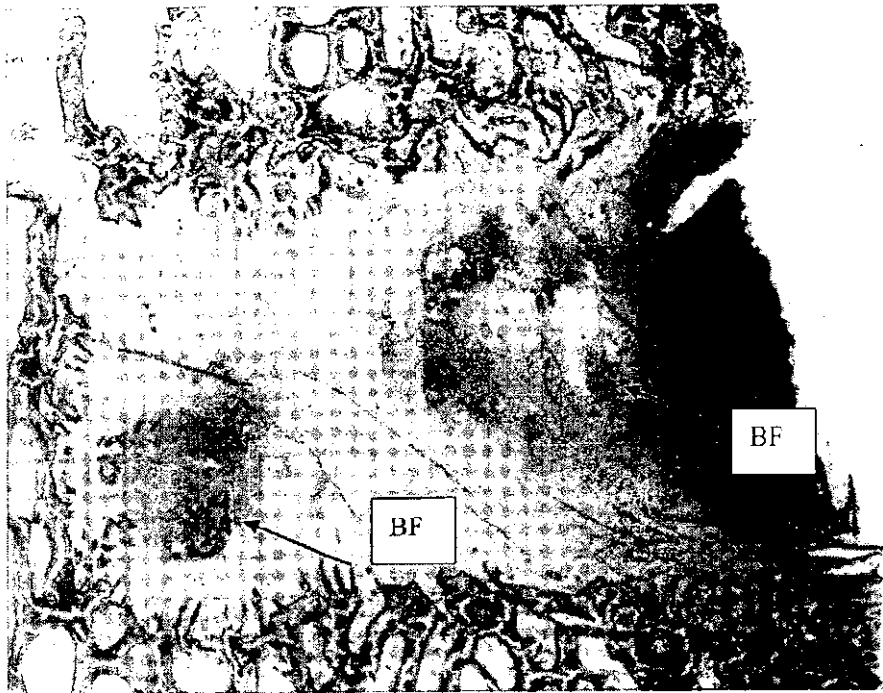


Fig. 33



Fig. 34

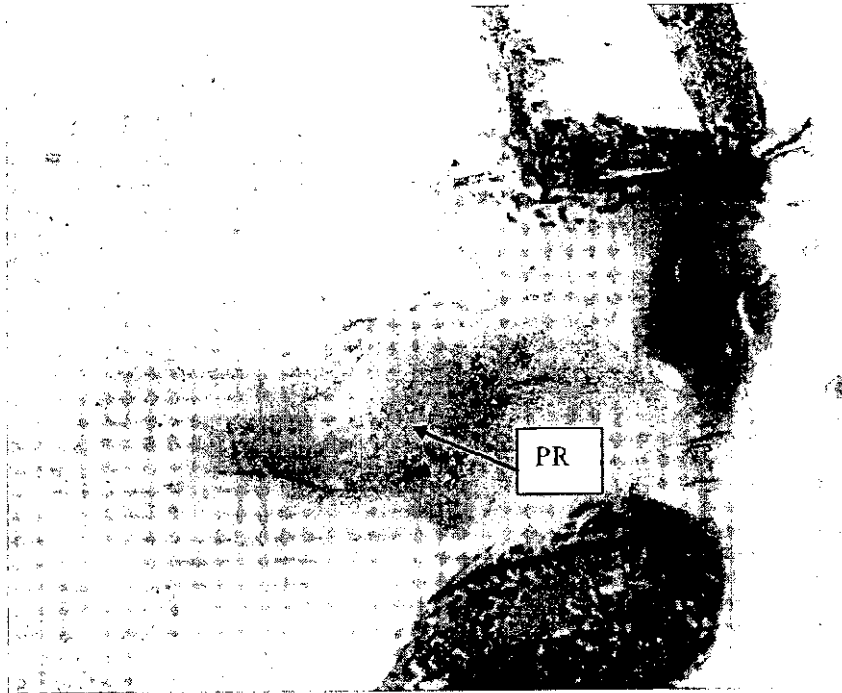


Fig. 35

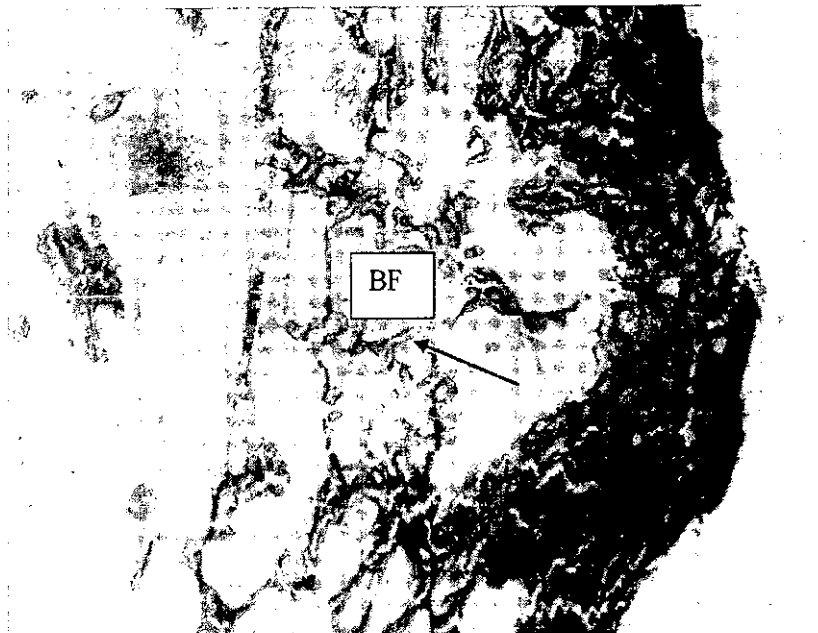


Fig. 36

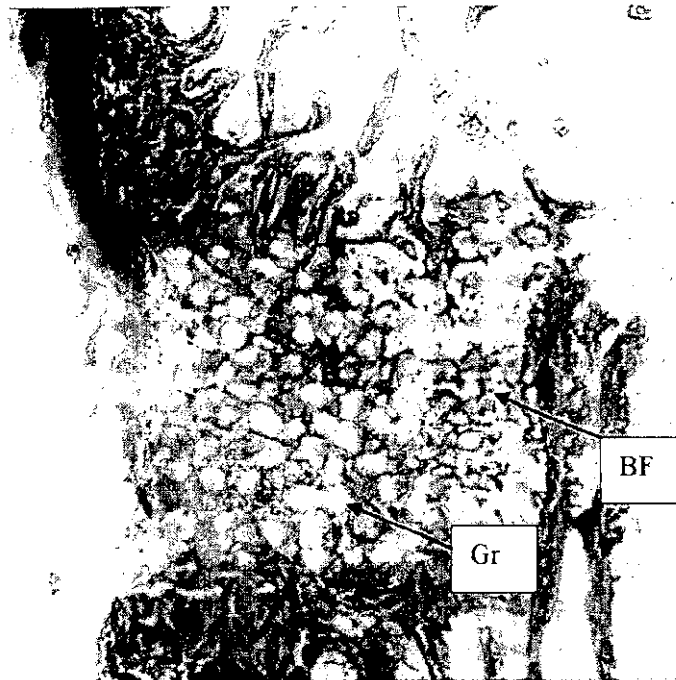


Fig. 37

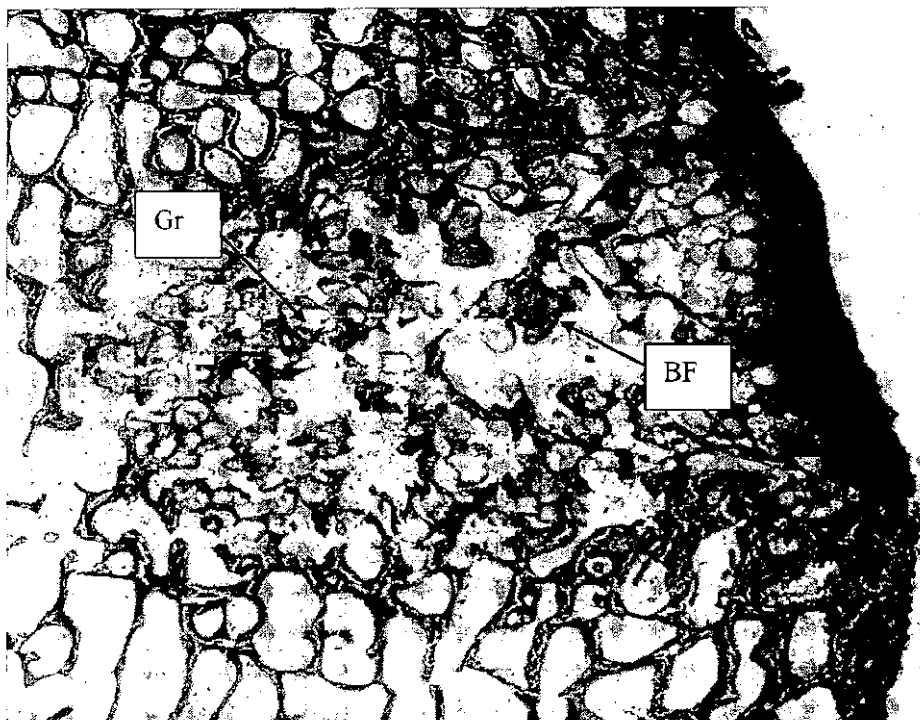


Fig. 38

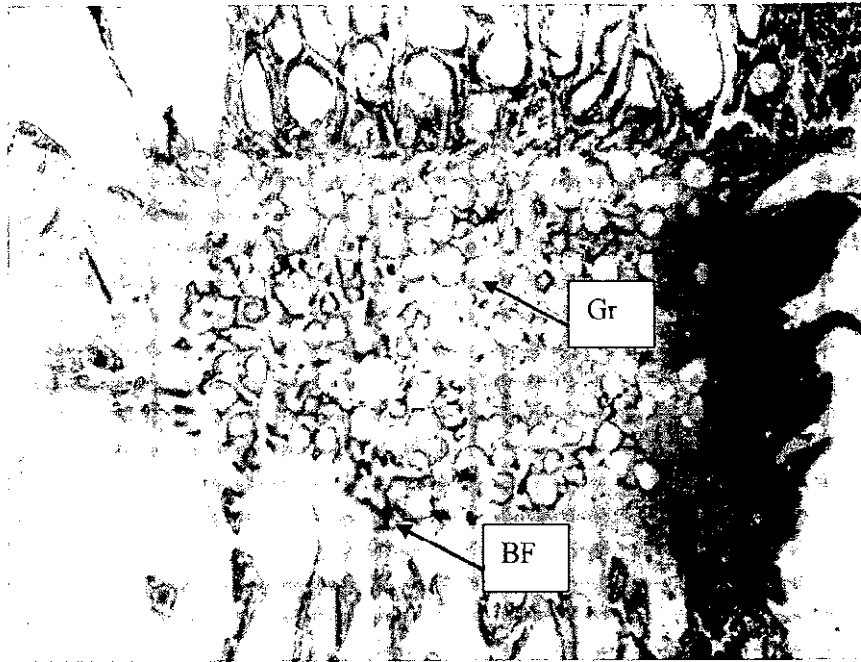


Fig. 39

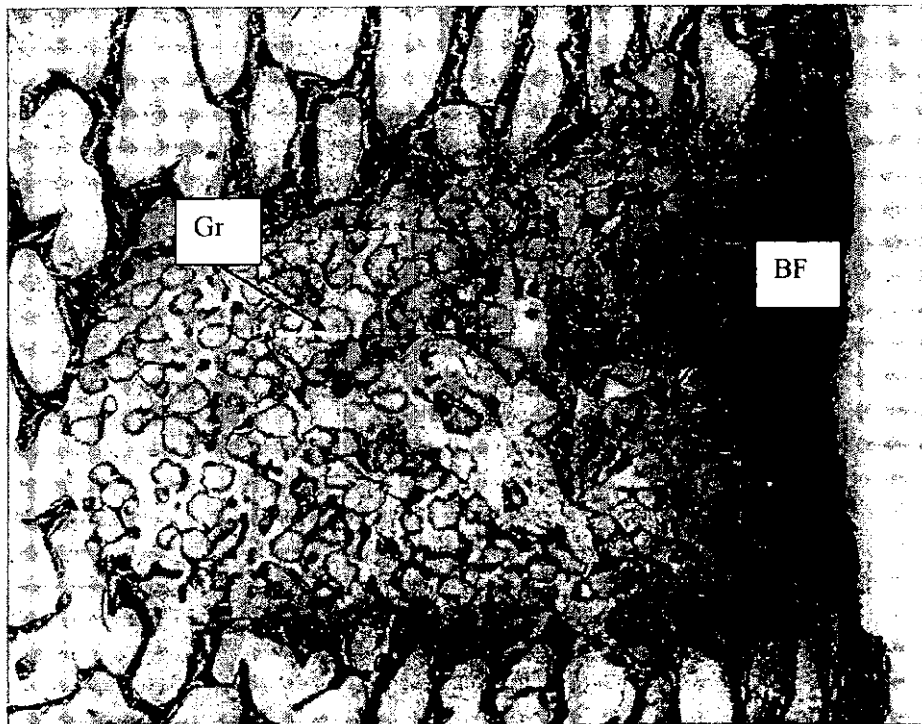


Fig. 40

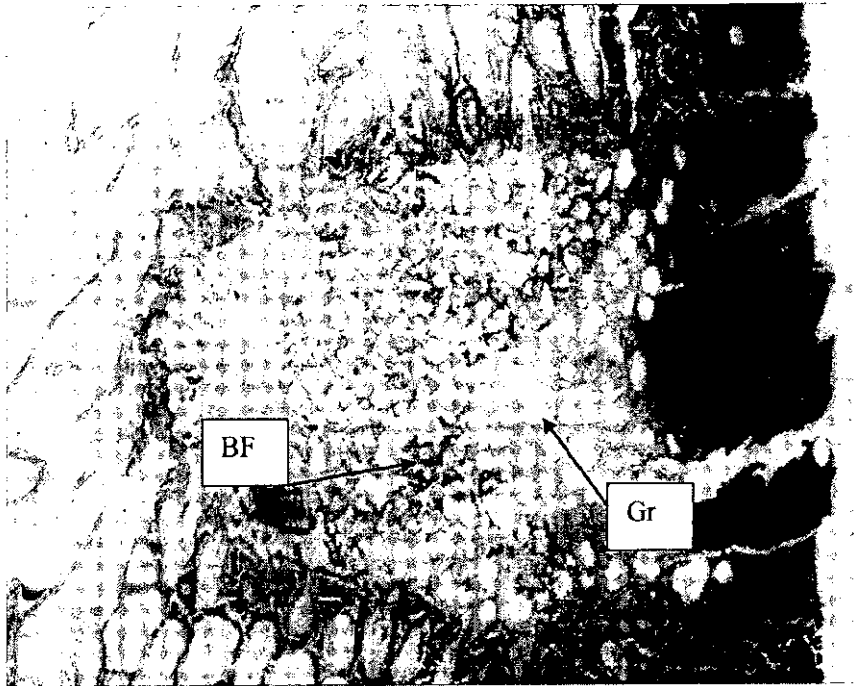


Fig. 41

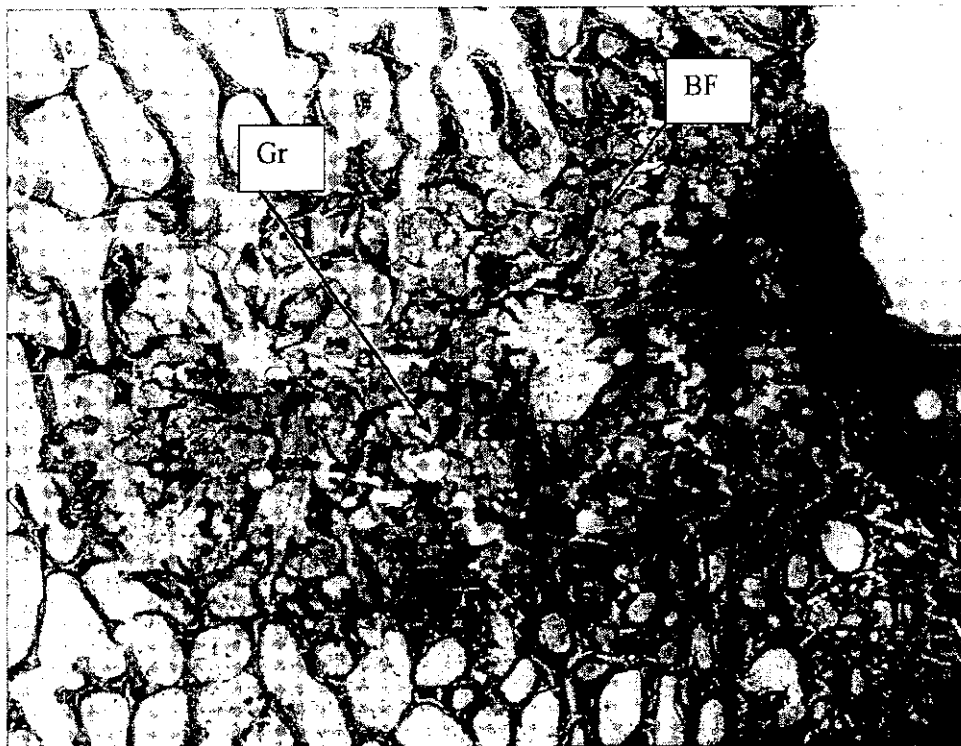


Fig. 42

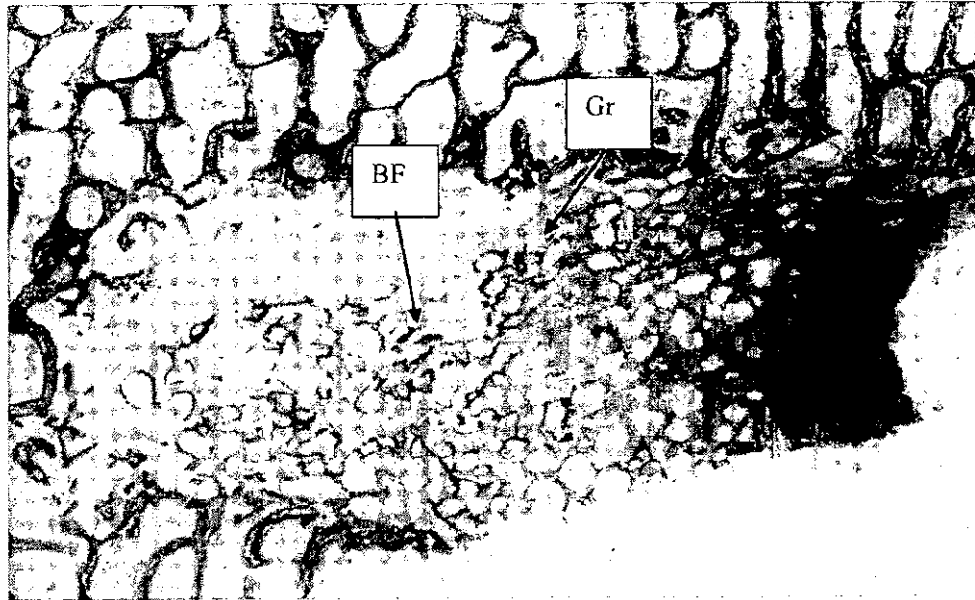


Fig. 43

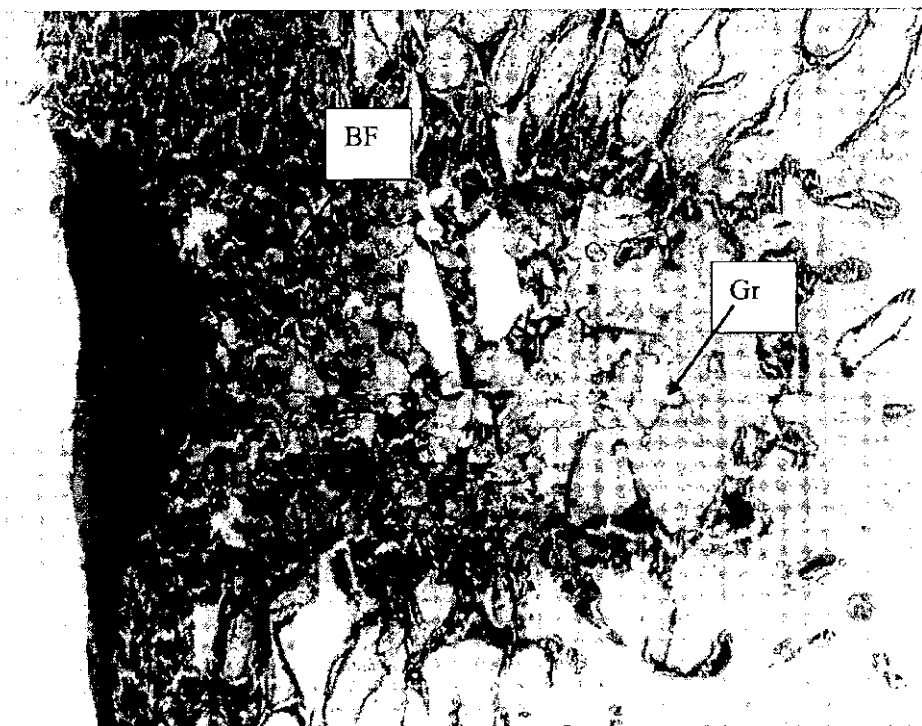


Fig. 44



Fig. 45



Fig. 46

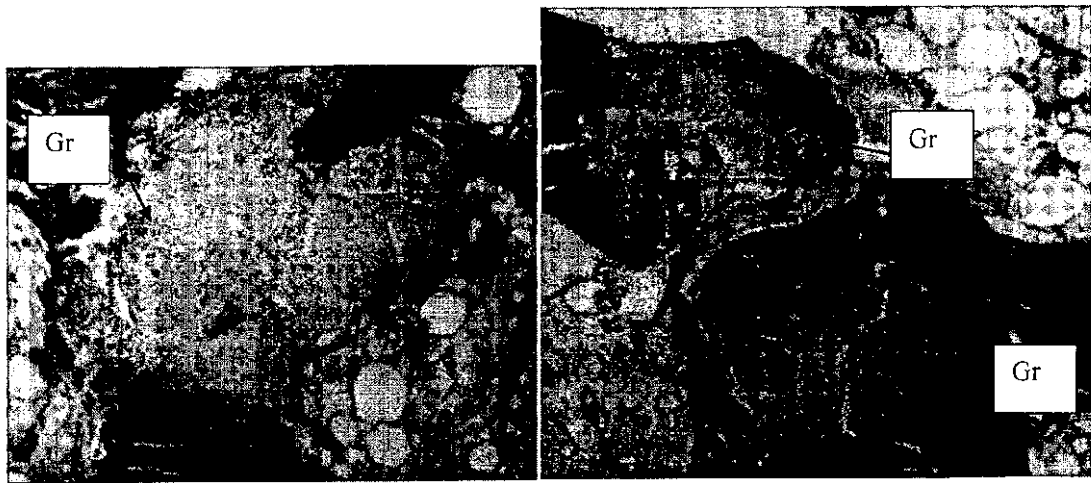


Fig. 47

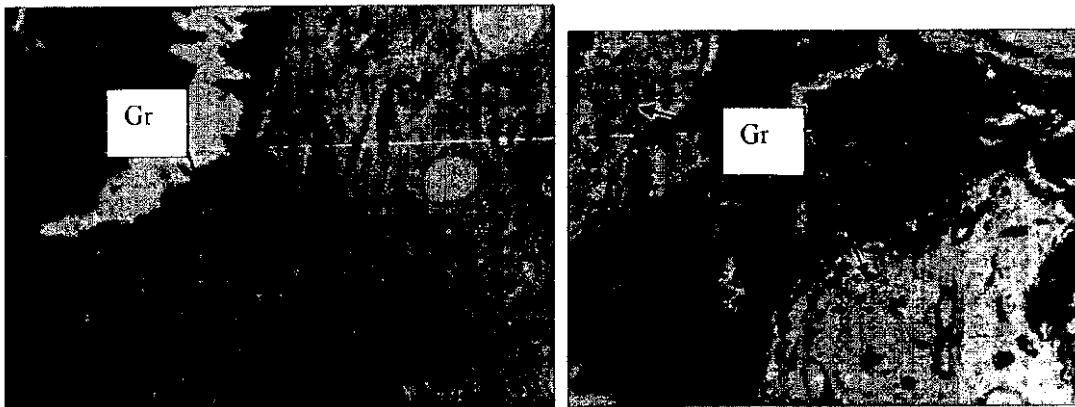


Fig. 48