

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 785**

51 Int. Cl.:

A61F 2/28 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2011 PCT/KR2011/007517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO2013047936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11873106 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2762175**

54 Título: **Método de fabricación de matriz ósea fibrosa desmineralizada**

30 Prioridad:

29.09.2011 KR 20110099016

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

19.06.2017

73 Titular/es:

**CG Bio Co., Ltd (100.0%)
223-23 Sangdaewon-dong Joongwon-gu Nnam
Kyunggi-do 462-120, KR**

72 Inventor/es:

**SONG, SEOK-BEOM;
JEONG, GOO-WON;
SO, JUNG-WON;
SEO, HAN-SOL;
RYU, HYUN-SEUNG;
KIM, GIUE-NAM y
KIM, BYOUNG-SUCK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 617 785 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

Método de fabricación de matriz ósea fibrosa desmineralizada

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada, más específicamente, a un procedimiento mejorado para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada, que comprende las etapas de desmineralización parcial, cortado, desmineralización completa, y pulverizado.

Antecedentes de la técnica

La matriz ósea desmineralizada (DBM, del inglés *Demineralized bone matrix*) se refiere a un hueso cuyos minerales se han eliminado al añadirlo a un ácido. La matriz ósea desmineralizada se compone principalmente de colágeno altamente reticulado y comprende las proteínas no colágenas restantes tales como TGF- β , PDGF, osteopontina, osteonectina, proteína morfogenética ósea (BMP) y similares. La matriz ósea desmineralizada se utiliza en una composición para implantes óseos, en la reparación de defectos óseos, etc.

La matriz ósea desmineralizada se obtiene de una forma particular, mediante la desmineralización de un hueso extirpado de un cuerpo, seguido de la pulverización en un tamaño apropiado. Los presentes inventores han descrito una composición de reparación ósea que comprende una matriz ósea desmineralizada que tiene un tamaño de partícula de 0,05 a 250 μ m; una matriz ósea desmineralizada que tiene un tamaño de partícula de 250 a 2000 μ m; y un material hidratante, en el que las matrices óseas desmineralizadas se mezclan en una cierta proporción. La composición de reparación ósea tiene unas excelentes propiedades inyectables y de mantenimiento de la forma (manipulación) (Patente coreana n.º 10-1041784).

Mientras tanto, el hueso cortical consiste en haces de fibras de colágeno que están orientados de forma paralela al eje longitudinal del mismo. Se sabe que la matriz ósea fibrosa desmineralizada obtenida a partir del mismo muestra propiedades útiles para implantes destinados a ser utilizados en reparaciones óseas y otras aplicaciones ortopédicas. La matriz ósea fibrosa desmineralizada se prepara moliendo un hueso cortical extirpado de un cuerpo con una maquinaria de molienda especial hasta que se obtiene una partícula que tiene una forma de fibra, seguido de una desmineralización de las partículas resultantes (patente de Estados Unidos n.º 5.607.269). Sin embargo, hay algunos inconvenientes, por ejemplo, que tal método necesita usar solamente ejes corticales intactos como una fuente ósea, debido a las limitaciones mecánicas de la maquinaria de molienda de hueso; y que el rendimiento del hueso fibroso desmineralizado es muy bajo. Con el fin de abordar dichos problemas, las patentes de Estados Unidos n.º 7.323.193 y 7.939.108 han descrito un procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada, que comprende desmineralizar las secciones del hueso obtenidas de un hueso extirpado de un cuerpo en una solución ácida durante 6 horas, desmineralizar lo resultante en una solución ácida durante dos días, y después pulverizar las secciones de hueso desmineralizadas. Sin embargo, los procedimientos descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 7.323.193 y 7.939.108 tienen el inconveniente de que la etapa de desmineralización necesita realizarse durante un largo período, es decir, durante dos días (48 horas).

El documento US 2004/097612 describe las fibras de matriz ósea desmineralizada y las composiciones de una matriz ósea desmineralizada. La composición de la matriz ósea desmineralizada tratada en este documento incluye fibras de matriz ósea desmineralizada que tienen una longitud media de la fibra en el intervalo de aproximadamente 250 micrómetros a aproximadamente 2 mm y una relación de aspecto mayor de aproximadamente 4; y un líquido biocompatible en una cantidad para producir una masa consistente y moldeable. La masa moldeable mantiene su cohesión cuando se sumerge en un líquido. También se proporcionan los procedimientos para hacer las fibras de la matriz ósea desmineralizada y la composición.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores han realizado investigaciones para desarrollar procesos de preparación de una matriz ósea fibrosa desmineralizada que tenga propiedades útiles, especialmente para desarrollar procesos con el fin de mejorar la etapa de desmineralización que requiere mucho tiempo. Como resultado, cuando el hueso parcialmente desmineralizado se corta para formar un hueso en forma de lámina delgada, las cuales entonces se desmineralizan, sorprendentemente, se ha descubierto que la etapa de desmineralización puede reducirse notablemente a aproximadamente 6 horas; y que se puede obtener con alto rendimiento la resultante matriz ósea fibrosa desmineralizada.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada, que comprende las etapas secuenciales de desmineralización parcial, cortado, desmineralización completa, y pulverizado.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada, comprendiendo dicho procedimiento: (a) realizar una primera etapa de desmineralización, desmineralizando un hueso extirpado de un cuerpo en una solución ácida de 1 a 5 horas; (b) cortar el hueso obtenido de la etapa (a) para formar un hueso en forma de lámina delgada que tenga un espesor de 0,1 a 3 mm; (c) realizar una segunda etapa de desmineralización, desmineralizando el hueso en forma de lámina delgada obtenido de la etapa (b) en una solución ácida durante 2 a 6 horas; y (d) pulverizar el hueso desmineralizado obtenido de la etapa (c).

En el procedimiento para preparar una matriz ósea desmineralizada, las soluciones ácidas de las etapas (a) y (c) pueden ser, independientemente entre sí, una solución de HCl de 0,1 a 3 N, preferentemente una solución de HCl 0,6 N. Y también, el pulverizado puede llevarse a cabo para obtener una matriz ósea desmineralizada que tiene una longitud que varía de 1000 a 5000 mm.

Efectos ventajosos

La presente invención ha descubierto recientemente que, mediante la realización de las etapas secuenciales de desmineralización parcial, cortado, desmineralización completa, y pulverizado, la etapa de desmineralización puede reducirse notablemente a aproximadamente 6 horas. Especialmente, se ha descubierto con la presente invención que, mediante la incorporación de una etapa de corte, la matriz ósea desmineralizada resultante puede obtenerse con alto rendimiento como una matriz ósea desmineralizada que tiene forma fibrosa, además de la reducción del tiempo de la desmineralización. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede aplicarse adecuadamente a la producción en masa industrial.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los huesos obtenidos mediante el corte de un hueso parcialmente desmineralizado (A) y los huesos obtenidos por pulverizado de un hueso desmineralizado (B).

La FIG. 2 muestra las imágenes obtenidas al observar con un microscopio óptico la matriz ósea desmineralizada en forma de fibra (A) y la matriz ósea desmineralizada en forma de partículas (B).

Mejor modo de realizar la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada, comprendiendo dicho procedimiento: (a) realizar una primera etapa de desmineralización, desmineralizando un hueso extirpado de un cuerpo en una solución ácida durante 1 a 5 horas; (b) cortar el hueso obtenido de la etapa (a) para formar un hueso en forma de lámina delgada que tenga un espesor de 0,1 a 3 mm; (c) realizar una segunda etapa de desmineralización, desmineralizando el hueso en forma de lámina delgada obtenido de la etapa (b) en una solución ácida durante 2 a 6 horas; y (d) pulverizar el hueso desmineralizado obtenido de la etapa (c).

El procedimiento de la presente invención incluye la realización de etapas secuenciales de desmineralización parcial, cortado, desmineralización completa, y pulverizado. Especialmente, mediante la introducción de las etapas de desmineralización parcial y cortado, el tiempo para la posterior etapa de desmineralización se ve notablemente reducido a aproximadamente 6 horas; y la matriz ósea desmineralizada puede obtenerse con alto rendimiento como una matriz ósea desmineralizada que tiene forma fibrosa.

El procedimiento de la presente invención incluye una etapa de desmineralización parcial, es decir, realizar una primera etapa de desmineralización, desmineralizando un hueso extirpado de un cuerpo con una solución ácida durante 1 a 5 horas [esto es, la etapa (a)]. El hueso extirpado de un cuerpo puede ser un hueso que provenga de un mamífero, incluyendo un ser humano. Es preferible usar el hueso después de haber quitado los tejidos blandos, lípidos, médula ósea, etc. del hueso extirpado del cuerpo, de acuerdo con los métodos convencionales. La limpieza puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, una solución de etanol del 60 al 90 % p/p. En caso necesario, se puede usar adicionalmente un tensioactivo. Normalmente, la solución ácida puede ser una solución de HCl tal como una solución de HCl de 0,1 a 3 N, preferentemente una solución de HCl de aproximadamente 0,6 N. Y también, la primera etapa de desmineralización puede realizarse durante 1 a 5 horas, preferentemente aproximadamente 3 horas.

El procedimiento de la presente invención incluye una etapa de cortado del hueso parcialmente desmineralizado en láminas delgadas, es decir, cortar el hueso obtenido de la etapa de desmineralización parcial para formar un hueso en forma de lámina delgada que tenga un espesor de 0,1 a 3 mm [esto es, la etapa (b)]. El cortado puede realizarse con un aparato apropiado para cortar finamente un hueso, por ejemplo, con un cortador de huesos tal como el Bone Slicer (YOU IL MC/CO. KR), pero sin limitarse a ese. El espesor del hueso en forma de lámina delgada obtenido mediante dicho cortador puede variar de 0,1 a 3 mm, preferentemente de 0,2 a 1,0 mm, más preferentemente de 0,3 a 0,6 mm, lo más preferentemente aproximadamente 0,5 mm. Cuando el espesor sobrepasa los 3,0 mm, se pueden obtener formas en partículas rotas (no una lámina delgada). Cuando el espesor está por debajo de 0,1 mm, se

puede obtener una lámina delgada; pero la posterior desmineralización de la lámina delgada resultante puede dar forma de partículas (no forma de fibras).

El procedimiento de la presente invención incluye una etapa de desmineralizar completamente el hueso parcialmente desmineralizado en láminas delgadas, es decir, realizar una segunda etapa de desmineralización, desmineralizando el hueso en forma de lámina delgada obtenido de la etapa anterior en una solución ácida durante 2 a 6 horas [esto es, la etapa (c)]. Normalmente, la solución ácida puede ser una solución de HCl tal como una solución de HCl de 0,1 a 3 N, preferentemente una solución de HCl de aproximadamente 0,6 N. Se ha descubierto con la presente invención que la segunda etapa de desmineralización, es decir, la etapa de desmineralización completa, puede realizarse en un tiempo notablemente reducido (es decir, en 2 a 6 horas, preferentemente en aproximadamente 3 horas), en comparación con los métodos conocidos de desmineralización.

El procedimiento de la presente invención incluye una etapa de pulverizado del hueso completamente desmineralizado [esto es, la etapa (d)]. El pulverizado puede realizarse con un aparato convencional de pulverización. El pulverizado puede llevarse a cabo para obtener una matriz ósea fibrosa desmineralizada que tiene una longitud que varía de 1000 a 5000 mm, preferentemente de 2.000 a 4.000 mm, lo que se puede conseguir estableciendo las condiciones de pulverización apropiadas de acuerdo con los tipos del aparato de pulverización utilizado.

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

De un hueso (peso: aproximadamente 172 g) que proviene de un donante humano, se retiraron los tejidos blandos unidos al hueso con un instrumento quirúrgico; y entonces las impurezas tales como tejidos blandos, lípidos, y médula ósea se retiraron utilizando un detergente para tejidos que contiene un tensioactivo. El hueso resultante se cortó por la mitad. Los huesos cortados se pusieron en una solución de 20 ml de HCl 0,6N por 1 g de hueso durante 3 horas, para la desmineralización parcial. Los huesos parcialmente desmineralizados se aislaron y entonces se pusieron en 20 ml de agua destilada por 1 g de hueso, con el fin de eliminar la solución desmineralizante en los huesos. Los huesos resultantes se cortaron con un cortador de huesos (YOU IL MC/CO. KR) en láminas delgadas que tienen un espesor de aproximadamente 0,5 mm. Los huesos resultantes en forma de lámina delgada se muestran en la FIG 1 (A). Los huesos resultantes en forma de lámina delgada se pusieron en 30 ml de solución de HCl 0,6N por 1 g de hueso durante 3 horas, para la desmineralización completa. La matriz ósea desmineralizada precipitada se aisló, se pulverizó con un aparato de pulverización (IKA, M20 Universal mill, GR) durante aproximadamente 10 minutos, se neutralizó con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se lavó con agua destilada, y entonces se liofilizó para obtener aproximadamente 31 g de matriz ósea desmineralizada. En la FIG 2(A) se muestra la imagen obtenida al observar la matriz ósea desmineralizada resultante con un microscopio óptico. Del resultado de la FIG 2(A), se puede observar que la matriz ósea desmineralizada resultante es una matriz ósea desmineralizada que tiene forma de fibras.

Ejemplo comparativo 1

De un hueso (peso: aproximadamente 165 g) que proviene de un donante humano, se retiraron los tejidos blandos unidos al hueso con un instrumento quirúrgico; y entonces las impurezas tales como tejidos blandos, lípidos, y médula ósea se retiraron utilizando un detergente para tejidos que contiene un tensioactivo. El hueso resultante se cortó por la mitad. Los huesos cortados se pusieron en una solución de 20 ml de HCl 0,6N por 1 g de hueso durante 3 horas, para la desmineralización parcial. Los huesos parcialmente desmineralizados se aislaron y entonces se pusieron en 20 ml de agua destilada por 1 g de hueso, con el fin de eliminar la solución desmineralizante en los huesos. Los huesos resultantes se pusieron de nuevo en una solución de 30 ml de HCl 0,6N por 1 g de hueso durante 3 horas, para la desmineralización. Sin embargo, debido a que la desmineralización apenas se procesó, los investigadores no pudieron obtener una matriz ósea desmineralizada.

Ejemplo comparativo 2

De un hueso (peso: aproximadamente 192 g) que proviene de un donante humano, se retiraron los tejidos blandos unidos al hueso con un instrumento quirúrgico; y entonces las impurezas tales como tejidos blandos, lípidos, y médula ósea se retiraron utilizando un detergente para tejidos que contiene un tensioactivo. El hueso resultante se cortó por la mitad. Los huesos cortados se pusieron en una solución de 20 ml de HCl 0,6N por 1 g de hueso durante 3 horas, para la desmineralización parcial. Los huesos parcialmente desmineralizados se aislaron y entonces se pusieron en 20 ml de agua destilada por 1 g de hueso, con el fin de eliminar la solución desmineralizante en los huesos. Los huesos resultantes se pulverizaron con un aparato de pulverización (IKA, M20 Universal mill, GR) durante aproximadamente 60 minutos para obtener huesos pulverizados, que se muestran en la FIG 1 (B). Los huesos pulverizados se pusieron en una solución de 30 ml de HCl 0,6N por 1 g de hueso durante 3 horas, para la desmineralización completa. La matriz ósea desmineralizada precipitada se aisló, se neutralizó con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se lavó con agua destilada, y entonces se liofilizó para obtener aproximadamente 36,4 g de matriz ósea desmineralizada. En la FIG 2(B) se muestra la imagen obtenida al observar la matriz ósea

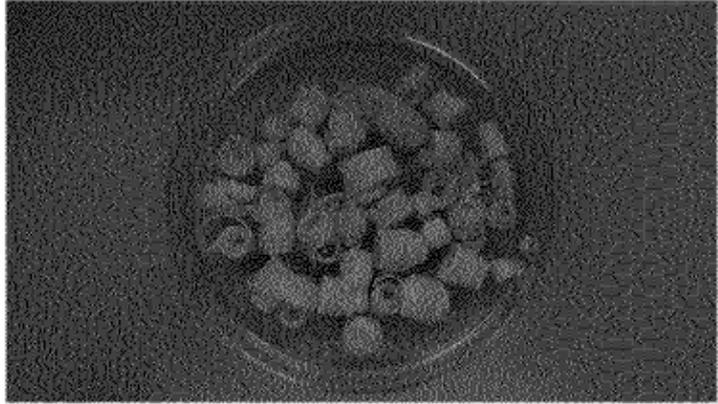
desmineralizada con un microscopio óptico. Del resultado de la FIG 2(B), se puede observar que la matriz ósea desmineralizada es una matriz ósea desmineralizada que tiene forma de partículas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada, comprendiendo el procedimiento: (a) realizar una primera etapa de desmineralización, desmineralizando un hueso extirpado de un cuerpo en una solución ácida durante 1 a 5 horas; (b) cortar el hueso obtenido de la etapa (a) para formar un hueso en forma de láminas que tengan un espesor de 0,1 a 3 mm; (c) realizar una segunda etapa de desmineralización, desmineralizando el hueso en forma de láminas obtenido de la etapa (b) en una solución ácida durante 2 a 6 horas; y (d) pulverizar el hueso desmineralizado obtenido de la etapa (c).
- 10 2. El procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada de la reivindicación 1, en el que las soluciones ácidas de las etapas (a) y (c) son, independientemente entre sí, una solución de HCl de 0,1 a 3 N.
- 15 3. El procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada de la reivindicación 2, en el que las soluciones ácidas de las etapas (a) y (c) son una solución de HCl de 0,6 N.
4. El procedimiento para preparar una matriz ósea fibrosa desmineralizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el pulverizado se lleva a cabo con el fin de obtener una matriz ósea desmineralizada que tenga una longitud de 1000 a 5000 μm .

FIG. 1

(A)



(B)

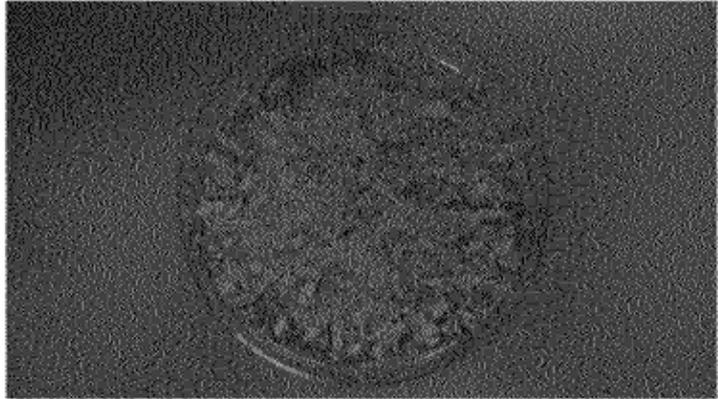


FIG. 2

