

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 159**

51 Int. Cl.:

A61L 27/56 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

C01B 25/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2012 PCT/US2012/057492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13049306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2012 E 12835928 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2760490**

54 Título: **Método de preparación de carbonato de apatito poroso a partir de hueso natural**

30 Prioridad:

29.09.2011 US 201113248762

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

18.07.2019

73 Titular/es:

**COLLAGEN MATRIX, INC. (100.0%)
15 Thornton Road
Oakland, NJ 07436, US**

72 Inventor/es:

**LI, SHU-TUNG;
CHEN, HUI-CHEN y
YUEN, DEBBIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 159 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 preparación de carbonato de apatito poroso a partir de hueso natural

Antecedentes

5 Los materiales de injerto óseo que contienen calcio sintético actuales usados clínicamente incluyen sulfato de calcio, carbonato de calcio (basado en coral), y varios compuestos de fosfato de calcio (por ejemplo, fosfato tricálcico, hidroxiapatita). Los materiales que contienen calcio sintético tienen la desventaja de bien reabsorberse demasiado rápido (por ejemplo, sulfato de calcio) o demasiado lento (por ejemplo, hidroxiapatita), lo que impactaría de manera negativa en la regeneración y crecimiento del hueso.

10 El carbonato de apatito es la estructura mineral del hueso natural. A diferencia de la estructura altamente cristalina de la hidroxiapatita, el carbonato de apatito en el hueso tiene un grado más bajo de cristalinidad. El grado más bajo de cristalinidad permite al hueso rotar y remodelarse en vivo, particularmente bajo la influencia de condiciones de estrés mecánico. Si el mineral puede ser aislado a partir de hueso natural sin cambiar de manera significativa su estructura, sería un material de injerto óseo más adecuado.

15 Los métodos para preparar mineral a partir de hueso natural incluyen los que usan disolventes orgánicos (por ejemplo, etilendiamina) bajo condiciones de reflujo (véase, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. 2.938.593, 5.167.961 y 5.417.975), y los que usan tratamiento térmico a una temperatura generalmente más alta de 900°C (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. 4.654.464). Estos métodos tienen varias desventajas, tales como generar residuos de disolvente tóxico, alterar la estructura del mineral óseo, y hacer mineral óseo que cause reacciones de tejidos. Véase, por ejemplo, Gardner, A.F., J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv, 1964, 22: p. 332-40.

20 Un método para la preparación de sustituto de injerto óseo a partir de hueso natural es también conocido por el documento WO 2008/032928, en el cual piezas de fémur equino son hervidas en agua purificada durante 72 horas, secadas a 60°C durante 24 horas, y pulverizadas. El polvo es desengrasado mediante la inmersión en una mezcla de cloroformo y metanol, y tratado con hipoclorito de sodio. Posteriormente, el material es tratado hidrotermalmente a 121°C, y finalmente calcinado en un horno a 600°C.

25 Existe la necesidad de un método que genere cantidades comerciales de carbonato de apatito altamente poroso, biocompatible y bioreabsorbible a partir de hueso natural sin cambiar la estructura de manera significativa de la fase del mineral y que no genere residuos tóxicos.

Compendio

30 Esta invención está basada en el inesperado descubrimiento de un método capaz de generar grandes cantidades de carbonato de apatito poroso para varias aplicaciones quirúrgicas médicas y dentales.

35 En consecuencia, descrito en este documento hay un método para preparar carbonato de apatito a partir de hueso natural. El método incluye obtener partículas de hueso esponjosas; mediante el tratamiento de las partículas de hueso con agua caliente y después su extracción con un compuesto alcohólico orgánico a temperatura ambiente; repetir el tratamiento y pasos de extracción al menos una vez; secar las partículas de hueso; y calentar las partículas de hueso a 500°C hasta 620°C durante 10 a 50 horas.

40 Para obtener las partículas de hueso, un hueso esponjoso puede ser primero limpiado para eliminar los tejidos adheridos, cartílagos pegados y hueso cortical. El hueso puede ser entonces molido en partículas que tienen un tamaño entre unos 2 mm hasta unos 15 mm, preferiblemente desde 5 mm a 10 mm. La uniformidad del tamaño de las partículas de hueso puede facilitar la eliminación de partes orgánicas poco asociadas a partir del hueso (por ejemplo, células, restos celulares y componentes de la sangre). Los tratamientos con agua caliente y el compuesto alcohólico orgánico (por ejemplo, etanol e isopropanol) sirven para eliminar materiales orgánicos no directamente asociados con el hueso (por ejemplo, lípidos, componentes de la sangre, células y restos). Las partículas de hueso preparadas de esta forma son entonces calentadas a un intervalo de temperatura específico durante 10 a 50 horas.

45 Las partículas de hueso son calentadas a 500°C hasta 620°C, preferiblemente entre 570°C hasta 610°C, y más preferiblemente entre 590°C hasta 605°C.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención son expuestos en los dibujos que acompañan y la descripción a continuación. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción y dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

50 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una gráfica que muestra un patrón de difracción de rayos X de mineral óseo inorgánico sinterizado (hidroxiapatita) y carbonato de apatito inorgánico.

La FIG. 2 es una gráfica que muestra un espectro de infrarrojos de carbonato de apatito inorgánico.

Descripción detallada

Esta invención se relaciona con un método de preparación de mineral de carbonato de apatito a partir de hueso natural de mamíferos que tienen una estructura substancialmente similar al mineral del hueso intacto. Particularmente, el método genera carbonato de apatito altamente poroso a partir de las epífisis de los mamíferos. La epífisis fresca, la cabeza expandida del hueso que contienen principalmente tejido óseo esponjoso (mullido), es la fuente principal de tejido óseo cosechado y proporcionado por los proveedores. Dado que el hueso mullido tiene tamaños de poros generalmente en el intervalo de 50 μm hasta 700 μm , es la estructura ideal para conducción de hueso y crecimiento de hueso nuevo.

El método descrito en este documento implica limpiar y procesar hueso mullido para eliminar componentes orgánicos asociados con el hueso, dejar el componente de cristal mineral intacto (carbonato de apatito) para aplicaciones de conducción y crecimiento óseo. Más específicamente, el método incluye calentar completamente partículas de hueso limpiadas bajo intervalos de temperatura y tiempo bien controlados que no causarán fases de transición significativas a partir de estructura de carbonato de apatito de bajo cristalino hasta hidroxiapatita alto cristalino.

Generalmente, el contenido de carbonato del carbonato de apatito preparado a partir del método es un el intervalo de sobre 1% hasta sobre 7% y el grado de los intervalos de cristalinidad sobre 45% hasta sobre 65%. La hidroxiapatita alto cristalino no tiene carbonato y tiene un grado de cristalinidad generalmente mayor del 98%. Así, el carbonato de apatito tiene cristales de tamaño más pequeño y un entramado de cristal menos perfecto que la hidroxiapatita. La significancia clínica del carbonato de apatito es que tiene una estructura similar a la del mineral en el hueso intacto. Así, cuando el carbonato de apatito es implantado, se comportará de manera más similar al mineral de hueso nativo, esto es, permitiendo rotar y remodelar en vivo tras nueva generación ósea.

Para practicar el método, la parte cortical del hueso, que incluye el periostio, tejidos blandos que se adhieren tejidos de cartílago unidos, es eliminado primero y el hueso mullido es molido en partículas. El tamaño de las partículas está generalmente en el intervalo de 2 mm a 15 mm, preferiblemente en el intervalo de 5 mm a 10 mm. Las partículas de hueso molidas son primero lavadas con agua fría para eliminar alguna sangre y componentes de médula asociados con el hueso mullido. Las partículas de hueso lavadas entonces van a través de al menos dos ciclos de agua caliente y tratamiento de compuesto alcohólico orgánico. El lavado con agua caliente a temperatura de ebullición durante, por ejemplo 2 a 8 horas, es preferido, lo que puede eliminar una buena parte de los restos de grasa, sangre y restos de células del hueso. Los compuestos alcohólicos orgánicos son usados para eliminar lípidos y lipoproteínas del hueso. Lavar con etanol o isopropanol (por ejemplo, 16 a 24 horas a temperatura ambiente) es efectivo a este respecto. El alcohol en combinación con éter puede ser usado a pequeña escala, pero el alcohol solo es preferido para minimizar los materiales tóxicos implicados en el método.

Las partículas de hueso limpiadas son entonces secadas (por ejemplo, a través el aire u horno) y tratadas térmicamente. El tratamiento térmico puede ser llevado a cabo en un horno. Por ejemplo, las partículas de hueso pueden ser puestas en crisoles (por ejemplo, crisoles grandes con sobre 50 g de partículas en cada uno), que son insertados en un horno comercial (por ejemplo, Thermo Scientific). La cantidad de partículas de hueso limpiadas usadas puede variar dependiendo de la capacidad del horno. Así, la producción puede ser ampliada mediante el uso de hornos con capacidad más grande que están disponibles comercialmente.

La temperatura del horno puede ser aumentada lentamente a la temperatura objetivo en el intervalo de 500°C a 620°C dentro de la primera hora. Una vez que la temperatura ha alcanzado la temperatura objetivo, las partículas de hueso son tratadas térmicamente por un periodo de 10 a 50 horas, preferiblemente a 570°C hasta 610°C durante 20 a 40 horas, y más preferiblemente a 590°C hasta 605°C durante 22 a 33 horas. Generalmente, la duración del tratamiento térmico está relacionada con el intervalo de temperatura seleccionado para el tratamiento. Por ejemplo, una temperatura más alta requerirá un tratamiento más corto. En cualquier evento, el periodo de tiempo seleccionado debería ser uno que sea suficiente para eliminar de manera efectiva los materiales orgánicos de las partículas de hueso.

El mineral de carbonato de apatito preparado de esta forma tiene una estructura substancialmente similar al mineral en el hueso intacto. El método descrito en esta invención es aplicable a todos los tejidos de huesos de animales incluyendo pero no limitado a bovino, porcino, equino y ovino siempre que los huesos sean limpiados y molidos al tamaño como se ha descrito.

El ejemplo específico a continuación es para ser interpretado como meramente ilustrativo, y no limitativo del resto de la descripción en cualquier modo. Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basado en la descripción en este documento, usar la presente invención en toda su extensión.

Preparación de mineral de hueso natural

Las partículas de hueso molido recibidas del suministrador fueron primero lavadas con agua fría durante 2-4 horas. Las partículas de hueso lavadas fueron entonces hervidas con agua durante 8 horas, cambiando el agua cada dos horas. Las partículas de hueso limpiadas con agua caliente fueron extraídas en isopropanol durante 18 horas para eliminar lípidos y lipoproteínas. Los pasos de limpieza con agua caliente e isopropanol fueron repetidos una vez

dentro del periodo de tiempo definido (8 horas de extracción de agua caliente y 18 horas de extracción de isopropanol). Las partículas de hueso limpias así preparadas fueron entonces secadas con aire o secadas con horno durante 24 horas.

- 5 Después del secado, aproximadamente 50 g de las partículas de hueso limpias fueron puestas en cada uno de cuatro crisoles. Los crisoles fueron transferidos a un horno, y tratados térmicamente a 595°C durante 33 horas. Los crisoles fueron entonces enfriados en el horno. Seis hornos fueron calibrados y usados de manera simultánea para producir una gran cantidad de carbonato de apatito, aproximadamente 600 g.

Caracterización del mineral de hueso natural

- 10 Los minerales de hueso de carbonato de apatito producidos mediante el procedimiento anterior fueron caracterizados por los métodos siguientes.

(1) Difracción de rayos X

- 15 Los patrones de difracción de rayos X (XRD) proporcionan información sobre la estructura entramada, el tamaño de los cristales y el porcentaje de cristalinidad del mineral. Los análisis de XRD fueron hechos mediante el uso del difractor de rayos X PHILIPS PW1710, y escaneados desde 20 a 40 grados (escala de 2θ) para obtener reflexiones clave para la identificación de la estructura de apatito.

- 20 El patrón XRD del mineral de hueso inorgánico como se preparó anteriormente mostró reflexiones de mineral clave típicas a 211 y 002 de hidroxiapatita altamente cristalina. Vea la Fig. 1. El espectro ancho del mineral óseo de este modo preparado indicó un tamaño de cristal más pequeño al compararlo con aquel de hidroxiapatita sinterizada, que mostró un espectro característicamente estrecho y picos más agudos. También vea la Fig. 1. Mediante el uso de la ecuación de Scherer, el tamaño de cristal promedio en la dirección-002 fue estimado a ser 29,4 nm para el mineral óseo preparado como anteriormente, comparado con los 45,3 nm para la hidroxiapatita. El porcentaje de cristalinidad del mineral del mineral óseo fue determinado a ser $54,2 \pm 1,3\%$ (en base a un promedio de 3 ranuras) al compararlo con el 99% de la hidroxiapatita.

(2) Espectroscopia de infrarrojos

- 25 La espectroscopia de infrarrojos (IR) proporciona información relacionada con la estructura de un producto en términos de sus grupos funcionales. El espectro de infrarrojos de las muestras fue obtenido a partir de muestras preparadas como bolitas de KBr con muestra % peso, y mediante el uso de un espectrofotómetro de infrarrojos de transformada de Fourier (Perkin-Elmer 983G).

- 30 El espectro de IR del mineral preparado anteriormente fue similar al espectro del hueso natural consistente en mineral de carbonato de apatito que incluye: las bandas de ion de fosfato (modo de curvado antisimétrico v4 P-O agudo (550 cm^{-1} a 600 cm^{-1}); modo de extensión antisimétrico v3 (1030 cm^{-1} con 1100 cm^{-1} de espalda); y la banda de ion de carbonato (CO_3) (modo de extensión antisimétrico v2, 1400 cm^{-1} – 1500 cm^{-1}). Véase la Fig. 2.

- 35 El contenido de carbonato en el mineral óseo fue determinado en base a una curva estándar construida mediante el establecimiento del área de integración de red del área de absorción del carbonato ($923\text{-}1332 \text{ cm}^{-1}$) al área de absorción de fosfato ($1332\text{-}1633 \text{ cm}^{-1}$) versus diferente contenido de carbonato. El mineral óseo como se preparó anteriormente tenía contenido de carbonato de $2,0 \pm 0,3\%$ (promedio de 3 mediciones \pm S.D.)

(3) Relación de calcio al fosfato

- 40 Una muestra del hueso de mineral como se preparó anteriormente fue hidrolizada en ácido nítrico para asegurar la total disolución de la muestra. Tras enfriarla, la muestra fue hecha a volumen, mezclada y disuelta para el análisis de calcio y fosfato mediante el método de Cromatografía de Plasma Acoplada de manera Inductiva. Las soluciones estándar del calcio y fosfato fueron preparadas para su cálculo y corrección. Se determinó que el mineral óseo tenía una relación de calcio/fosfato de 1,57 (promedio de 3 mediciones \pm S.D.).

(4) Contenido no mineral (contenido orgánico residual)

- 45 El contenido de proteína residual fue determinado mediante el análisis del contenido del % de nitrógeno en el producto de mineral mediante el método de combustión. El resultado del análisis fue grabado como un peso del nitrógeno encontrado en la muestra, y el % del contenido de nitrógeno fue calculado. El contenido de proteína residual fue calculado en base a la asunción de que el contenido de nitrógeno promedio en la proteína es 13,6% w/w (derivado mediante la división del peso promedio del nitrógeno en todos los aminoácidos por el peso molecular promedio de todos los aminoácidos). Además, el contenido extraíble de metanol fue aplicado para determinar el
50 contenido de lípidos en el producto de mineral óseo. Se determinó que el mineral óseo tenía un contenido de proteína de $0,75 \pm 0,08\%$ y un extraíble de metanol de $0,03 \pm 0,01\%$ (promedio de 6 mediciones \pm S.D.).

(5) Estudio en vivo

5 Un estudio animal fue realizado en un modelo de defecto de femoral de conejo para evaluar la biocompatibilidad y eficacia del mineral óseo de carbonato de apatito derivado natural preparado anteriormente. A nueve animales se le implantó el mineral óseo. Fueron sacrificados a las 4, 8, y 14 semanas. Histológicamente, el mineral implantado mostró crecimiento interno del hueso evidenciado por nuevo hueso y formación de médula ósea. No había señal de ningún problema de seguridad, pues había falta de inflamación y un bajo número de células gigantes asociadas con el mineral implantado en todos los puntos de tiempo. Se concluyó que el producto de mineral es biocompatible, osteoconductor sin ninguna reacción de tejido no deseada significativa.

Otras realizaciones

Todas las características descritas en esta especificación pueden ser combinadas en cualquier combinación.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar carbonato de apatito a partir de hueso natural, el método que comprende:
obtener partículas de hueso esponjoso;
5 tratar las partículas de hueso con agua caliente y entonces extraerlas con un compuesto alcohólico orgánico a temperatura ambiente;
repetir los pasos de tratamiento y extracción al menos una vez;
secar las partículas de huesos; y
calentar las partículas de hueso a 500°C hasta 620°C durante 10 a 50 horas;
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el tamaño de las partículas de hueso es entre 2 mm hasta 15 mm, preferiblemente de 5 mm hasta 10 mm.
3. El método de la reivindicación 1, donde el compuesto alcohólico orgánico es isopropanol o etanol.
4. El método de la reivindicación 1, donde las partículas de hueso son tratadas con agua caliente durante 2 a 8 horas.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, donde las partículas de hueso son extraídas con el compuesto alcohólico orgánico durante 16 a 24 horas.
6. El método de la reivindicación 5, donde el compuesto alcohólico orgánico es isopropanol.
7. El método de la reivindicación 1, donde la temperatura del agua caliente es 80°C hasta 100°C.
8. El método de la reivindicación 1, donde las partículas de hueso son calentadas a 590°C hasta 605°C.
- 20 9. El método de la reivindicación 1, donde las partículas de hueso son calentadas durante 20 a 40 horas, preferiblemente durante 22 a 33 horas.
10. El método de la reivindicación 8, donde las partículas de hueso son calentadas durante 22 a 33 horas.
11. El método de la reivindicación 1, donde las partículas de hueso son obtenidas primero mediante la eliminación de tejidos adheridos, tejidos de cartílagos y la parte cortical del hueso, y entonces moliendo la parte esponjosa del hueso en partículas.
- 25 12. El método de la reivindicación 1, donde el paso de calentamiento es llevado a cabo en un horno.



