



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **311007**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ A 61 L 27/00

Patentstyret

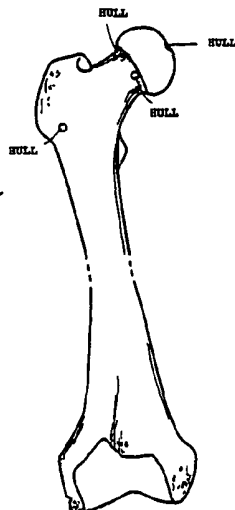
(21) Søknadsnr	19962874	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1995.01.23, PCT/US95/00880
(22) Inng. dag	1996.07.08	(85) Videreføringsdag	1996.07.08
(24) Løpedag	1995.01.23	(30) Prioritet	1994.01.21, US, 184164
(41) Alm. tilgj.	1996.09.03		
(45) Meddelt dato	2001.10.01		

(71) Patenthaver	Osteotech Inc, 1151 E. Shrewsbury Avenue, Shrewsbury, NJ 07702, US
(72) Oppfinner	Brenda Smith Morse, Chamblee, GA, US Clement D. Dioh, Marietta, GA, US
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for preparering av ben for transplantasjon, samt ben passende for transplantasjon

(56) **Anførte publikasjoner** RU 952189, FR 2637502, WO 9312731

(57) **Sammendrag** Det er beskrevet en fremgangsmåte for preparering av ben for transplantasjon, hvilket ben inneholder en indre matrix som i seg selv innbefatter fjernbart materiale, hvilken fremgangsmåte innbefatter trinnet med å føre benet i kontakt med en atmosfære ved et trykk lavere enn omgivende trykk. I tillegg innbefatter fremgangsmåten et ytterligere trinn hvor benet holdes i kontakt med et dekontamineringsmiddel eller et rensmiddel under en periode ved kontakt med atmosfæren på benet. Det er også beskrevet en fremgangsmåte for behandling av den indre matrix til benet som inneholder en forutbestemt mengde fjernbart materiale, hvilken matrix også inneholder en forutbestemt mengde lipid som i vesentlig grad immobiliserer det fjernbare materialet, hvilken fremgangsmåte innbefatter trinnet med å føre matrixen i kontakt med en atmosfære ved et trykk lavere enn omgivende trykk, for en tidsperiode effektiv til å redusere lipid-innholdet under den forutbestemte mengden derav.



Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for preparering av ben for transplantasjon, hvilket ben inneholder en indre matrix som i seg selv består av fjernbart materiale.

Oppfinnelsen vedrører også ben passende for transplantasjon i en pasient.

5

Foreliggende oppfinnelse vedrører således fremgangsmåter for behandling av ben for transplantasjon. Mer spesielt er oppfinnelsen rettet mot tilveiebringelsen av dekontaminert ben, transplantasjon av hvilket i vesentlig grad minimaliserer eksponeringen av transplantatresipienten for kontaminerende patogener eller immunogenisk materiale.

10

Tilveiebringelsen og behandlingen av menneskelig ben for transplantasjon er en komplisert oppgave som krever koordinasjon av flere grupper, innbefattende donorens familie, sykehuspersonalet, den lokale frembringelsesgruppen, blodbehandlingslaboratoriet, benbehandlingslaboratoriet, transplantatpasienten og transplantasjonsteamet.

15

En viktig overveielse er minimalisering av risikoen for å overføre potensielt skadelige sykdommer til vevsmottageren. Tilveiebringelsen av benvev som er sikkert for transplantasjon, utgjør en meget spesiell utfordring siden immunogent materiale og også mikro-organismer og virus kan finnes dypt inne i den indre matriksen til benprøvene.

20

Med hensyn til dette, må det analyseres blodprøver ved behandlingslaboratoriet for en lang rekke kjente infeksjonsmidler, innbefattende for eksempel

25

Humant immunodeficiency virus (HIV-1)
Humant immunodeficiency virus (HIV-2)
Humant T celle lymphotropisk virus (HTLV-1)
Hepatitt B
Hepatitt C
Cytomegalisk virus (CMV)
Treponema pallidum (syfilis).

30

Med hensyn til de alvorlige kliniske konsekvensene som oppstår ved transplantasjon av kontaminert ben, se for eksempel Kakaiya et al., "Tissue transplant-transmitted infections", Transfusion 31 (3), 1277-284, 1991; Shutkin, "Homologous-serum hepatitis following use of refrigerated bone-bank bones, report of a case", Journal of Bone and Joint Surgery, 16-A(1), 160-162, 1954. Overføring av humant immunodeficiency virus (HIV) via ben såvel som via benmarg har også vært rapportert: "Transmission of HIV

35

- through bone transplantation case report and public health recommendations" Novbid. Mortal. Weekly Rep., 37, 597-599, 1988; Furlini et al.; "Antibody response to Human immunodeficiency virus after infected bone marrow transplant", Eur. J. Clin. Microbiol. Dis. 7(5) 554-665, 1988. HIV er blitt kultureret fra såvel frisk som avkjølt ben og frysetørket ben. Buck et al. "Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation", Clin. Ortho., 251, 249-253, 1990. I tillegg vil beskyttelse av teknikkerne ved benbehandlingslaboratoriet være et stort problem på grunn av den alvorlige muligheten for overføring av HIV og hepatitt B.
- 10 En ytterligere og meget viktig betraktning med hensyn til utformingen av benbehandlingsmetodene, er å unngå eller minimalisere immunrespons (innbefattende transplantatforkasting) i resipientpasienten fra donor makromolekyler som er igjen i det transplanterte benet, så som kollagener, celleoverflateantigener av hovedhistokompatibilitetskomplekset eller andre glykoproteiner. Se for eksempel Friedlander og
- 15 Horowitz, Orthopedics, 15(10), 1171-1175 (1992), og Mankin, et al., Id., ved 1147-1154.

Det er derfor stort behov for benbehandlingsmetoder som reduserer risikoen for recipient immunologisk respons eller overføring av sykdommer forbundet med bruk av og preparering og tilveiebringelse av transplanterbart ben. Med hensyn til dette er det også viktig

20 å innse at selv om det anvendes kjente metoder for donorscreening, kan ikke nyere infeksjoner i en spesiell donor detekteres, og derved understrekes viktigheten av forbedret rensing og dekontamineringsbehandling som gir profilaktiske beskyttelse mot potensielle, eller hittil ikke-detekterte, infeksjonsmidler.

- 25 Kombinasjonen av donorscreening og antibiotisk behandling som tradisjonelt anvendes ved benbehandling reduserer, men begrenser ikke til et akseptabelt nivå, risikoen for overføring av kjente viralkontaminanter og en lang rekke bakterier. Se for eksempel Scarborough, N.L., Orthopedics, 15(10), 1161-1167 (1992), og Malinin, T.I., "Acquisition and Banking of Bone Allografts", i Bone Grafts and Bone Substitutes, Habal and Reddi, eds., Chapter 19, side 206-225, W.B.Saunders Company, Philadelphia, PA (1992). Som tidligere nevnt, gir ikke nåværende tilgjengelige metoder profilaktisk beskyttelse fra virus, utvalgte bakterier og fungi som er i den vanlige floraen i mennesker eller i et sykehusmiljø. Selv om sensitiviteten og spesifisiteten til screeningstestene for
- 30 slike patogener er høy, er screeningstester ikke idiotsikre, og det kan for eksempel oppstå feil resultater ved lave antilegemsnivåer (for eksempel nyere infeksjon eller svekkelse av immunsystemet) eller også av tekniske feil. Videre kan screeningstester være anvendelige

for å identifisere kjente infeksjonsdannende midler. I tillegg vil ikke de tidligere nevnte tradisjonelt brukte antibiotiske antibakterielle blandinger som brukes nå for tiden, lett kunne drepe alle typer bakterier. For eksempel vil en vanlig bruke polymyxin/basitrasin-løsning (50.000 enheter basitrasin/500.000 enheter polymyxin B) ikke inaktivere Proteus typer. Videre vil tradisjonelle antibiotikablandinger ikke ha noen betydelig virkning på viruser eller fungi.

Det er også betydelige begrensninger på hvilken grad dekontamineringsmidler med hell har blitt brukt for å penetrere og dekontaminere benmatrix. Se Prolo og Oklund,
10 "Sterilization of Bone by Chemicals", i Osteochondral Allografts-Biology, Banking and Clinical Applications, Friedlaender et al., eds., kapittel 22, side 233-238, Little, Brown and Company, Boston MA (1983). Benmatrix inneholder potensielt fjernbare materialer, for eksempel marg, celler og lipid som gir tilgang for dekontaminanter dypt inne i benmatrixen, hvor de tidligere nevnte infeksjonsmedførende stoffene eller immunogene
15 makromolekyler kan være til stede.

Fra FR 2635702 er det kjent å behandle et benlignende materiale med et rensemiddel under lavtrykk.

20 Fra WO 93/12731 er det kjent en fremgangsmåte for behandling av ben for å gjøre det egnet for transplantasjon. Benet kontaktes med et globalt dekontamineringsmiddel. Benet blir rensed og blir dekontaminert ved at det bringes i kontakt med et dekontamineringsmiddel.

25 Fra RU 152189 er det kjent og behandlet ben med lavt trykk.

Visse vanskeligheter som påtreffes ved å ekstrahere fjernbare materialer fra benmatrix er beskrevet, men ikke løst, i henhold til britisk patentsøknad 964.545, publisert i 1964.

30 Denne beskrivelsen beskriver en prosedyre for anvendelse av et fettløsningsmiddel (for eksempel en kloroform/metanolblanding) for rensing av ben. Tidsperiodene som dette medfører er ikke i overensstemmelse med de foretrukne benlagringsprosedyrene for raskt å kunne tilpasse en donorbenstykke av passende størrelse for en mottaker. En ytterligere ulempe som hevdes å være forbundet med denne metoden, er at den synes å være
35 begrenset til en serie trinn som må utføres i en spesiell rekkefølge. Dersom dette ikke gjøres, hevdes det at immunogene donorproteiner blir igjen i benet på grunn av in situ denaturering derav, forårsaket av fettløsningsmidlet.

Disse og andre vanskeligheter forbundet med tilvebringelsen av dekontaminert ben passende for transplantasjon, er løst i henhold til oppfinnelsen.

- 5 Foreliggende oppfinnelse vedrører oppdagelsen av at manipulering av atmosfærisk trykk som den indre matrixen av benet utsettes for under rensingen eller dekontamineringen derav, er spesielt effektivt ved tilveiebringelse av ben passende for transplantasjon. Det foreslås derfor ifølge oppfinnelsen en fremgangsmåte som angitt i patentkrav 1.
- 10 I følge oppfinnelsen foreslås det også ben passende for transplantasjon i en pasient, fremstilt i henhold til fremgangsmåten i følge patentkrav 1.

- Ytterligere trekk ved fremgangsmåten er angitt i de uselvstendige patentkrav, og i krav 20 fremheves en fremgangsmåte ved behandling av en indre matrix til et ben som
- 15 inneholder en forutbestemt mengde fjernbart materiale, hvilken matrix også inneholder en forutbestemt mengde lipid som i vesentlig grad immobiliserer det fjernbare materialet, idet denne fremgangsmåten kjennetegnet ved at matrixen behandles ifølge fremgangsmåten som angitt i krav 1, der matrixen blir holdt i kontakt med atmosfæren med et trykk lavere enn omgivende trykk over en tidsperiode effektiv til å redusere
- 20 lipidinnholdet under den forutbestemte mengden derav.

Eksempler på kliniske indikasjoner som kan behandles med dekontaminert ben fremstilt i henhold til utøvelse av foreliggende oppfinnelse, er kne-og hoftekirurgi og transplantater av lårbenshoder, proximal tibia og distale femurer.

25

- I henhold til utøvelse av foreliggende utvikling, er det fastslått at lipid i benmatrixen i betydelig grad påvirker rensingen og dekontamineringen derav. Et viktig aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringer derved som nevnt en fremgangsmåte for behandling av den indre matrixen til benet som består av en forutbestemt mengde fjernbart materiale,
- 30 hvilken matrix også inneholder en forutbestemt mengde lipid som i vesentlig grad immobiliserer det fjernbare materialet, hvilken fremgangsmåte innbefatter trinnet med å føre matrix i kontakt med en atmosfære ved mindre enn omgivende trykk i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere lipidinnholdet under den forutbestemte mengden derav.
- 35 Et ytterligere trekk ved oppfinnelsen er som nevnt en fremgangsmåte for behandling av ben som inneholder indre matrix som i seg selv inneholder en forutbestemt mengde fjernbart materiale med en vesentlig affinitet for benet, hvilken fremgangsmåte innbefatter

trinnet med å føre matrixen i kontakt med atmosfæren ved lavere enn omgivende trykk og deretter opprettholde atmosfæren i kontakt med denne, for en tidsperiode tilstrekkelig til å redusere mengden av fjernbart materiale under den forutbestemte verdien derav.

- 5 I tillegg tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte hvor ben utsettes for forhøyet temperatur før, under eller etter kontakt med en atmosfære ved mindre enn omgivende trykk.

Disse og andre trekk, egenskaper og fordeler ved foreliggende oppfinnelse vil fremgå av
10 den etterfølgende detaljerte beskrivelsen av oppfinnelsen.

Figur 1 viser en skisse av et lårben og viser posisjonen til borede hull, passende for å forenkle tilgangen til fjernbart materiale i benet.

- 15 Figur 2 er en skisse av lårbenshodet og viser posisjonen til borede hull som er passende for å forenkle tilgangen til fjernbart materiale i benet.

Figur 3 viser en skisse av et femuralhode og viser posisjonen til de borede hull, passende for å forenkle tilgangen til fjernbart materiale i benet.

- 20 Figur 4 viser en skisse av et høyre lårben og viser posisjonen til borede hull, passende for å forenkle tilgangen til fjernbart materiale i benet.

Figur 5 er et fotografi som viser det forbedrede benet fremstilt i henhold til utøvelsen av
25 foreliggende oppfinnelse.

I henhold til oppfinnelsen er det tilveiebragt en enkel, sikker og effektiv metode for å behandle ben og gjøre det passende for transplantasjon som innbefatter:

- 30 a) føre benet i kontakt med et globalt dekontamineringsmiddel effektivt til å inaktivere bakterier, fungi, virus og parasitter;
b) rense benet og
c) til slutt dekontaminere det rensede benet ved å føre det i kontakt med et global dekontamineringsmiddel effektivt til å inaktivere bakterier, fungi, virus og parasitter.
- 35 Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for å rense ben som kan anvendes i trinn (b) ved fremgangsmåten beskrevet over og innbefatter å føre benet i kontakt med vaskemiddel under høytrykksvaskebetingelser ved forhøyede temperaturer.

I foreliggende beskrivelse er begrepet "ben" brukt i sin mest omfattende betydning og innbefatter alle typer humant eller animalsk benvev, innbefattende hele ben, benstykker, benblokker med tilhørende bindevev så som ligamenter og tendon, såvel som malte
5 benpreparater og malte demineraliserte benpreparater.

Den initiale eller primære dekontamineringen skjer ved å føre ben i kontakt med et globalt dekontamineringsmiddel effektivt til å inaktivere bakterier, virus, fungi og parasitter.

10

Kontakttiden bør være tilstrekkelig til effektivt å inaktivere infeksjonsdannende midler. Fortrinnsvis blir benet nedsenket i den globale dekontamineringsløsningen for minst 2 eller flere minutter, fortrinnsvis 10 eller flere minutter og fortrinnsvis minst en eller flere timer. Under denne primære dekontamineringen, kan benet fjernes fra løsningen for
15 fjerning av ytre vev og fett og føres deretter tilbake til løsningen for ytterligere bløting.

Det globale dekontamineringsmiddel bør være effektivt til å inaktivere bakterier, virus, fungi og parasitter. Foretrukne dekontamineringsmidler er jodoform. Anvendelige jodoformer innbefatter polyvinyl pyrrolidon-jodin (PVP-I eller povidon jodin) preparater
20 som er kommersielt tilgjengelig fra Purdue-Frederick Company, ISP (tidligere GAF), og BASF. PVP-I preparater som er anvendelige ved utøvelse av oppfinnelsen, innbefatter de med molekylvekt mindre enn 20.000 så som PVP-Iodin 17/12 fra BASF.

Det har blitt fastslått at foretrukne PVP-I preparater er de med molekylvekt mindre enn
25 100.000 og fortrinnsvis med en midlere molekylvekt på ca. 35.000 eller en k-verdi på ca. 26-32, for eksempel PVP-Iodin 30/06 fra BASF.

Alternativt kan passende jodoformløsninger fremstilles ved å blande sammen en løsning av komplekseringsmidlet (polyvinyl pyrrolidon i tilfelle med PVP-I) med den ønskede
30 molekylvekt og molekylært jod i tilstrekkelige mengder til å gi den ønskede tilgjengelige jodkonsentrasjonen. For eksempel kan en tilgjengelig jodkonsentrasjon på ca. 1 vekt-% oppnås ved å løse 90G PVP i vann, deretter tilsette 10g jod under røring og til slutt tilsette tilstrekkelig vann til å bringe det totale volumet til 1 liter. Andre forhold mellom PVP og jod kan anvendes for å oppnå en PVP-I løsning som gir den ønskede
35 tilgjengelige jodkonsentrasjonen. Passende tilgjengelige jodkonsentrasjoner er 0.03 til 1 vekt-% jod til løsningen, fortrinnsvis 0.1% til 0.5%.

Andre dekontamineringsmidler som er funnet å inaktivere en lang rekke infeksjonsdannende forbindelser (innbefattende bakterier, fungi, parasitter og virus) er hydrogenperoksid, etanol, ozon, etylenoksid, bestråling og bruk av ovennevnte i kombinasjoner og med PVP-I.

5

Den globale dekontamineringsmiddelløsningen bør ha en konsentrasjon effektiv til å inaktivere bakterier, virus, fungi og parasitter. Jodoforkonsentrasjonen til den primære dekontamineringsløsningen er fortrinnsvis i området fra 0.5 til 10% og mest foretrukket 1 til 5 vekt-% med en tilgjengelig jodkonsentrasjon på 0.05 til 1%, fortrinnsvis 0.1 til 0.5 vekt-%. PVP-I konsentrasjonen er fortrinnsvis i området fra 0.5 til 10% og mest foretrukket 1 til 5 vekt-% av PVP-I, med en tilgjengelig jodkonsentrasjon på 0.05 til 1%, fortrinnsvis 0.1 til 0.5 vekt-%.

Den primære dekontamineringsløsningen kan innbefatte et vaskemiddel, fortrinnsvis en konsentrasjon på 0.1 til 5% av løsningen, mer foretrukket 1 til 3%, og mest foretrukket 0.1 til 1 vekt-%. Anioniske, kationiske, amphotære og ikke-ioniske rensemidler er passende. Foretrukne rensemidler er ikke-ioniske rensemidler som polyetoksyetylenetere (for eksempel de som markedsføres under varemerket Triton® fra Rhom & Haas av Union Carbide) eller polyoksyetylen sorbitan fettsyre-estere (Tween-seriene markedsført blandt annet av ICI og Sigma). Mest foretrukne rensemidler er oktyl-
fenoksyetylen (20) sorbitan monooleat (Tween® 80) mest foretrukket. Fortrinnsvis
skjer den primære dekontamineringen ved å bløte benet i en løsning på 0.1 til 5% PVP-I
og 1% (vekt) Triton X-100® i minst to minutter eller flere minutter, fortrinnsvis 10 eller
flere minutter og mest foretrukket minst en eller flere timer.

Det er nylig funnet ut at den mest fordelaktige primære dekontamineringsprosedyren medfører å bløte benet i en løsning av 1 til ca. 5% PVP-I, uten rensemiddel, for minst 1 til 2 timer. Fortrinnsvis, på grunn av forholdet mellom fritt jod til kompleksert jod ved forskjellige konsentrasjoner av PVP-I, er det funnet at en mest fordelaktig modifikasjon av dette trinnet medfører først å bløte benet i en 5% PVP-I i ca. ½ til 1½ time etterfulgt av fjerning (debridement) og en ytterligere bløting i en 1% PVP-I i ca. ½ til 1½ time.

Som eksempel 1 viser, er det innledende dekontamineringstrinnet i henhold til oppfinnelsen mer effektivt enn den kjente antibiotikablandingen. PVP-I er det foretrukne dekontamineringsmidlet på grunn av sin raske virkning, det store spekter av infeksjonsdannende forbindelser som den kan inaktivere (virus såvel som bakterier, fungi og

parasitt) og sin relativt lave toksitet til humant vev. Videre er PVP-I funnet å inaktivere HIV. Det innledende dekontamineringstrinnet beskytter ikke bare benresipienten ved i betydelig grad å redusere risikoen for infeksjoner fra benet, men beskytter også laboratorieteknikerne. Den primære dekontamineringsløsningen, enten den inneholder
5 PVP-I eller PVP-I og rensemiddel, vil videre gjøre benet lettere å rense ved først å løsne eller mykne mykt vev, lipider og blodprodukter.

Rensing etter den primære dekontamineringen kan skje ved hjelp av konvensjonelle metoder, men skjer fortrinnsvis ved å føre benet i kontakt med et rensemiddel på en slik
10 måte at fett, marg og annet fjernes. Rensemidlet lyserer cellene (for eksempel blodceller), oppløser fett og løser proteiner som benmargen består av. Renseprosedyren kan innbefatte røring og/eller forhøyede temperaturer. Kraftig røring er mest foretrukket og kan skje ved hjelp av en gyratorshaker. En slik vasking gir et ben som har neglisjerbar marg, celler, fett og annet og gir en ytterligere sikkerhetsmargin for transplantat-
15 resipienten ved fjerning av celler som kan inneholde infeksjonsdannende forbindelser og/eller biomolekyler som kan medføre en immunrespons.

Passende, foretrukne og mest foretrukne rensemidler er de samme som beskrevet over for det primære dekontamineringsmidlet. Rensemiddelkonsentrasjonen er anbefalt til ca.
20 0.1 til 5%, mer foretrukket 1 til 3% og mest foretrukket ca. 0.1 til 1 vekt-%. Selv om jodofor kan tilsettes de rensemiddelholdige løsningen i en konsentrasjon på 0.1 til 10%, er det funnet at det er foretrukket å utelate tilsetning av dette.

Mest fordelaktig blir benet renses med en rensemiddelløsning under høytrykks-
25 vaskebetingelser ved forhøyet temperatur. Høytrykks vaskebetingelser gir en tilstrekkelig kraft til å drive renseløsningen inn i benets indre matrix. Slike høytrykks vaskebetingelser innbefatter for eksempel kraftig røring, så som en gyrator malingsspannrister, eller høytrykksskyller så som med en høytrykks (eller hastighet) væskestråle. Passende malingboksriste innbefatter de som fremstilles av Red Devil,
30 fortrinnsvis modell # 0-5400-OM (615 rpm og 0.25 hestekrefter). Trykket til væskestrålen er fortrinnsvis 100 til 3.000 psi og mest foretrukket 500 til 1.500 psi. Mest foretrukket er væskestrålen steril og innbefatter vaskemiddel. Rensing akselereres i betydelig grad og blir mer gjennomgående dersom den skjer ved temperaturer innen området fra 20 til 80°C, og fortrinnsvis ved en forhøyet tempepratur på 37 til 80°C, mest
35 foretrukket ca. 50 til 65°C. Høytrykksvaskingen vil effektivt løsne marg og progressivt fjerne løst materiale i den porøse benmatrixen. Etter denne høytrykksvaskeprosedyren er

benet betydelig renere og hvitere enn ben behandlet ved hjelp av standardmetoder (se figur 5).

For å påskynde rensingen kan løsningen endres, for eksempel ved å overføre benet til frisk løsning under renseoperasjonen. Fortrinnsvis blir løsningen byttet minst to ganger. Etter rensingen vil vaskemidlet til slutt bli fjernet ved gjentatt vasking med sterilt vann. En biologisk akseptabel alkohol, så som etanol, kan brukes for å fjerne vaskemidlet. Dersom alkoholen brukes, må den fjernes ved rensing med sterilt vann.

10 Dersom det skal renses benblokker med tilhørende festet vev, bør vevet (for eksempel sener, ligamenter, menisker) dekket med en steril kledning så som plastomhylning eller en steril omhylning under renseprosedyren, slik at det unngås kontakt med vaskemidlet.

Benet kan videre renses og dekontamineres ved å eksponere det til hydrogenperoksid, som også har bakteriedrepende egenskaper. Etter rensing med resemidlet overføres benet til en 0.5 til 10%, fortrinnsvis 3%, hydrogenperoksidløsning i en tilstrekkelig tid til å oppnå ytterligere hvitning og fjerning av spor fett. Det kan anvendes røring. Inkubasjonstiden er passende 5 til 120 minutter, spesielt 5 til 60 minutter, og mest foretrukket 15 til 30 minutter. Etter behandlingen blir peroksidrester fjernet ved en omhyggelig vasking med sterilt vann.

Etter rensingen blir benet til slutt dekontaminert før pakking. Denne endelige dekontamineringen skjer ved å føre benet i kontakt med et globalt dekontamineringsmiddel for minst 2 eller flere minutter, fortrinnsvis minst 10 eller flere minutter og mest foretrukket 30 til 60 eller flere minutter. Et mest foretrukket globalt dekontamineringsmiddel er polyvinylpyrrolidonjodiv ved 1% (vekt/volum).

Når det er brusk og bindevev tilstede, inneholder dekontaminerings- og renseløsningene fortrinnsvis natriumklorid eller andre biologisk akseptable salt, i en mengde tilstrekkelig til å forhindre at PVP-I konsentreres i brusken eller bindevevet. Fortrinnsvis anvendes det 0.01 til 0.75 M NaCl, og mest foretrukket 0.15 M NaCl.

Det globale dekontamineringsmiddel som anvendes for den endelige dekontamineringen kan fjernes fra benet ved vasking med sterilt vann, eller etterlates som et tynt belegg for ytterligere å beskytte benet mot infeksjonsdannende midler. Det således belagte benet kan lyofiliseres.

Mest foretrukket blir det dannet et PVP-I belegg. PNP-I løsningen som fester seg til benet gir en rik, gylden ravlignende farge som kan virke som indikator på at benet har blitt behandlet. Om ønskelig kan det ravfargede benet lyofiliseres direkte, pakkes og lagres ved romtemperatur, fortrinnsvis i ravfargede krukker. Selv om det er kjent flere
5 forskjellige metoder for lyofilisering av vev, er en fremgangsmåte som er funnet tilfredsstillende for lyofilisering av ben, frysetørking i ca. 10 til 168 timer, fortrinnsvis ca. 20 til 28 timer. Rester av PVP-I på det lyofiliserte benet vil fortsatt gi beskyttelse til det fjernes ved vasking eller av kroppsvæsker eller implanteringen. På samme måte kan benet dekket med andre passende globale dekontamineringsmidler, PVP-I, eller
10 blandinger derav.

Alternativt kan restene av det globale dekontamineringsmidlet fjernes ved rensing med sterilt vann eller inaktiveres ved kjemisk reaksjon. Den opprinnelige off-white benfarge kan derved gjenvinnes. Iodoformer kan inaktiveres kjemisk ved å tilsette et
15 reduksjonsmiddel, så som natriumaskorbat eller tiosulfat, til bløtningsløsningen etter at den nødvendige bløtningstiden er ferdig. Den reduserende løsningen bør ha en molaritet og en mengde tilstrekkelig til å inaktivere det gjenværende molekylære jod. For eksempel bør 50 til 100 mikroliter av 1 M natriumaskorbatløsning være tilstrekkelig til å inaktivere 10 ml 1% PVP-I. Denne behandlingen fører løsningen tilbake fra mørk bruk
20 til en klar farge og benet får tilbake sin naturlige farge.

Etter dette endelige dekontamineringstrinnet, kan benet lyofiliseres eller kryopreserveres eller ferskfryses for lagring.

25 En fagmann innen området vil legge merke til at ben som er behandlet på den heri beskrevne måte, er anvendelig for alle terapeutiske anvendelser hvor ben brukes, for eksempel bentransplantasjoner, hoftekirurgi og knekirurgi.

Det er et anerkjent behov for teknologi som er istand til å tilveiebringe ben for
30 transplantasjon som effektivt minimaliserer alvorlige risiki for infeksjon og immunogenitet forbundet med nåværende transplantasjonsprosedyrer. Fremskaffelse av ben for transplantasjon har imidlertid vist seg å være et meget vanskelig problem på grunn av nærværet i benstrukturen (den indre matriksen) som i vesentlig grad vil forhindre penetrering inn i benet av effektive mengder substanser som er anvendelig for
35 rensing og dekontaminering derav.

Ben er en spesialisert form for bindevev hvis hardhet skyldes deposineringen av mineralsubstans inn i en myk organisk matrix. Den indre matrixen til benet er innen området periferert til som materialene som finnes inne i benet, enten av (kompakt) kortikal eller (svampete) (trapikular) porøs type som typisk er organisert i strukturen og innbefatter for eksempel benfluidezr, ekstravaskulare og vaskulare fluider, forkalket benmatrix, benmarg (innbefattende rød eller fettmarg) og celler derav, osteogene celler, ekstracellulære og intracellulære lipider, og erytrositter. Slike materialer (bortsett fra generelt forkalket benmatrix) er innen området kjent å være fjernbare materialer, det vil si at de fortrinnsvis fjernes fra benet ved rensing og/eller dekontaminering derav, selv om det også er kjent at slike materialer har affinitet, typisk en vesentlig kapasitet, for ben og hulrommene i dette som de opptar. I foreliggende søknad hevdes det at det fjernbare materialet i matrixen har en betydelig affinitet for en benprøve når en vannbasert rense- eller dekontamineringsløsning i kontakt med dette ikke kan løsne en vesentlig del av materialet når løsningen er tilveiebragt i ca. 1 - 5 minutter som en strøm ved romtemperatur fra en kilde ved tilnærmet springvannstrykk.

Som tilveiebragt i foreliggende utførelsesform av oppfinnelsen, vil de tidligere nevnte materialene til den indre matrixen i betydelig grad påvirke rensingen og dekontamineringen av benet. I en vid forstand vil utviklingene av foreliggende utførelsesform av oppfinnelsen utgjøre en viktig oppdagelse ved at fjerning av slikt matrixmateriale, enten direkte eller indirekte, fra ben ment for transplantasjon, i sterk grad forenkles ved å plassere benprøven i et miljø hvor den kommer i kontakt med (eller plasseres i) en atmosfære med mindre trykk enn omgivelsene. I henhold til utøvelsen av oppfinnelsen er dette omgivende trykket ment å være ca. 1.0 atmosfære gasstrykk.

Det er også oppdaget i henhold til utøvelsen av oppfinnelsen av lipid enten den finnes som ekstracellulært eller intracellulært lipid i matrixen, har en tendens i vesentlig grad å immobilisere fjernbare komponenter i matrixen (for eksempel marg, celler, antigene makromolekyler, eller løse forbindelser fra noen av disse, og også selve lipidet) og forhindre eller begrense fjerningen av slike komponenter ved rense- og dekontamineringsprosedyrene så som for eksempel de som er beskrevet i forbindelse med foreliggende utførelsesform. Uten å være begrenset til noen spesiell teori, er det antatt at de vanndige rense- og dekontamineringsløsningene ikke effektivt kan penetrere den indre benmatrixen på grunn av nærværet av pakkeceller i margen og en hydrofob lipid barriere.

Denne virkningen er betydelig siden det er vel kjent for eksempel at fettceller er en viktig komponent til benmatrixen, hvor den gule benmargen nesten fullstendig består av fettceller (se for eksempel Tanaka, Y og Goodman, V.R., "Electron Microscopy of Human Blood Cells", kapittel 7, side 380, Harper and Row, New York, NY 1972). Et
5 fordelaktig trekk ved foreliggende utførelsesform av oppfinnelsen innbefatter derfor en behand-ling av den indre benmatrixen som inneholder en forutbestemt mengde fjernbart materiale, hvilken matrix også inneholder en forutbestemt mengde lipid som i vesentlig gtrad immobiliserer det fjernbare materialet i vesentlig grad, idet fremgangsmåten innbefatter trinnet med å føre matrixen i kontakt med en atmosfære med et trykk lavere
10 enn omgivende trykk, i en tid tilstrekkelig til å redusere lipidinnholdet under den forutbestemte mengden derav.

En lipidmengde hevdes å i vesentlig grad immobilisere det fjernbare materialet til benmatrixen når en vannbasert rense-eller dekontamineringsløsning ikke kan løsne dette
15 materialet når løsningen er bragt i kontakt med benprøven i ca. 1 til 5 minutter som en strøm ved romtemperatur fra en kilde med tilnærmet standard springvannstrykk.

I forbindelse med oppfinnelsen innbefatter "lipid" alle substanser som er kjent som dette innbefattende for eksempel triglycerider, frie fettsyrer, kolesterol og estere derav, og
20 "polare" lipider så som lecitin og sphingomyelin.

Preparering av transplanterbart ben

Ben passende for transplantasjon prepareres ved å anvende en fremgangsmåte som innbefatter trinnet med å føre benet i kontakt med en atmosfære med et trykk mindre enn
25 omgivende trykk, og minst et ytterligere trinn, enten før eller etter denne kontakten, som også innbefatter å føre benet i kontakt med en løsning innbefattende et rensmiddel eller et dekontamineringsmiddel. Fortrinnsvis utføres dette minst ene ytre trinnet etter kontakten med en lavtrykksatmosfære for å utnytte fordelene med åpning av kanalene i matrixen, forårsaket av lipidfjerningen. Foreliggende utførelsesform av oppfinnelsen definerer et stort antall ytterligere rense-eller dekontamineringstrinn, innbefattende de
30 som utføres ved en forhøyet temperatur, som kan kombineres i en sekvens og definerer en spesiell rense-eller dekontamineringsprosedyre. Foretrukne dekontamineringsmidler innbefatter som tidligere etylalkohol, hydrogenperoksid, klorheksidin, hypokloritt og jodoforer så som PVP-I (spesielt med en molekylvekt på mindre enn ca. 100.000). Med
35 hensyn til dette, refererer høy temperatur til en temperatur på mellom 37°C eller høyere, fortrinnsvis ca. 37°C til ca. 80°C, og generelt, mest foretrukket ca. 50°C til ca. 65°C, selv om optimale temperaturer kan bestemmes for individuelle prøver. Rense-og

dekontamineringstrinnene kan også utføres under 37°C. Foretrukne og representative eksempler på foreliggende utførelsesform, er gitt i eksemplene 6 til 9 nedenfor.

- Begrepet "ben" som anvendes i henhold til utøvelse av foreliggende utvikling av
- 5 oppfinnelsen, brukes i den mest generelle betydning og innbefatter alle typer humant eller animalsk benvev, innbefattende hele ben, benstykker, benblokker med tilhørende bindevev så som ligamenter og sener, hvilken prøve er istand til å gjenvinne den naturlige benintegriteten i en pasient, og bære vekten ved transplantasjonsstedet, hvor slike ben-
- 10 stykker typisk har minst en dimensjon på tilnærmet 10 mm eller større. Benprøver som er representative for de som kan anvendes ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse, innbefatter følgende produkter som er tilgjengelig fra Cryolife Orthopaedics, Inc., Marietta, GA (typisk solgt under varemerket VIP, Viral Inactivation Process): kanselløs blokk; kanselløse tuber; kondyle hele; kortikalstriper og stusser; tapper, bikortikal "cloward"; tapper, bikortikal "crock"; tapp, ilium trikorotikal "crock"; tapp, patellar
- 15 trikorotikal "crock"; femur, distal; femurhode; fibula, hele; humerus hode; ilium, hele; iliumplate; mandibel hemi; pelvis, hele; ribbe, medium; rotatorkuff; og ulna, hele. Utelukket fra definisjonen av ben er her malte benpreparater, malte demineraliserte benpreparater og benavskjær, alle utelukkede kategorier har følgende felles trekk:
- (1) de er ikke vektbærende benstrukturer ved at de ikke kan understøtte vekten i en
- 20 terapeutisk kontekst, for eksempel mindre enn ca. 5 mm tykkelse av kortikalbenet til en tibia eller femur i en pasient; og (2) på grunn av meget høyt overflate-til-volum-forhold av avskjær eller malt benprøve, bidrar lipidet ikke i noen vesentlig grad ved immobilisering av fjernbart materiale deri.
- 25 Anvendelse av ethvert trykk mindre enn omgivende verdi ligger innen praksis av oppfinnelsen, selv om det generelt er funnet (se eksemplene 6 til 10 som følger) at trykk på ca. 0.7 atmosfærer eller lavere generelt er nødvendig for å oppnå en anvendelig effekt, idet trykk på ca. 0.3 atmosfærer til ca. 0.1 atmosfære er generelt mest foretrukket. Det bør legges merke til at store benstykker (for eksempel femoralhode, distal femur og
- 30 proximal tibia) med betydelige kanselløse områder best behandles ved trykk fra ca. 0.2 til 0.13 atmosfærer. Optimale atmosfæriske trykk for anvendelse med spesielle benstykker, kan bestemmes for den spesielle anvendelsen og kan avhenge av den spesielle sekvensen og kombinasjonen av andre rense- eller dekontamineringstrinn gjennomført før det ene eller flere lavatmosfæretrykkkontakttrinnene. Optimal temperatur for å frembringe
- 35 kontakt til benet med trykk under omgivende, er generelt ca. 20 til 60°C. På samme måte er optimale tidsrom for å opprettholde trykket under omgivende, generelt i området fra 30 til 60 minutter, men kan bestemmes for hver anvendelse ved å måle forløpet av

blod og lipidekstraksjon (se eksempel 10). Generelt vil anvendelse av gasstrykk under omgivende i mindre enn to minutter være ineffektivt og lenger tid enn fire timer vil ikke gi noen ytterligere fordeler.

5 I forbindelse med utøvelse av oppfinnelsen, og med hensyn til å optimalisere betingelsene med lavt atmosfæretrykk som kan anvendes for dette, er det funnet at anvendelse av et for lavt trykk generelt også er ineffektivt. Anvendelsen av et for lavt trykk medfører en fryse-effekt ikke ulik det som sees i lyofiliseringsutstyr, det vil si de fjernbare materialene i benet forlater benet raskt først, men deretter vil ytterligere rensing eller dekontami-
10 nering ikke skje på grunn av in situ frysing av materialene innbefattende lipid. Det nøyaktige lave trykket hvor dette skjer, varierer som en funksjon av en rekke parametere, innbefattende frysetemperaturen til lipider, blod og marg og benoverflatearealet, hvor 0.001 atmosfære er representativt for et uakseptabelt trykk. Området av uakseptabelt lavtrykk kan bestemmes for enhver kombinasjon av benprøver og utstyr.

15 Det er også funnet at direkte eller indirekte kontakt av en atmosfære ved mindre enn 1.0 atmosfæres trykk med den indre matrixen til en benprøve fremmes ved å bore et eller flere hull med tilstrekkelig dybde inn i prøven (se for eksempel eksempel 7 til 10 og figurene 1 til 4). I forbindelse med dette aspektet i oppfinnelsen, kan følgende virke som
20 retningslinjer for utøvelse derav:

(1) når det er mulig, bør hullet eller hullene bores inn i et område i benprøven som bærer minimalvekt slik det er kjent innen området, se for eksempel figurene 1 til 4 i tilfelle med et femur.

25 (2) fortrinnsvis har hullene mellom 5 og 100 mm dybde, avhengig av typen av benprøven, hvor ca. 10 til 30 mm dybde er foretrukket for mange humane benprøver (se eksempler 7 til 10), innbefattende humant femur. Fortrinnsvis har hullene en diameter på mellom 0.5 og 3 mm, selv om antall, størrelse, dybde og plassering av hullene i stor
30 utstrekning må bestemmes av utøveren.

De følgende representative eksempler viser til å illustrere og beskrive nærmere foreliggende utførelsesformer av oppfinnelsen.

35 EKSEMPEL 1

Trinn 1: Primær dekontaminering

Humant ben ble innsamlet, kulturert og funnet å være kontaminert med en rekke bakterier og fungi innbefattende:

- Staphylokokkus spesier (koagulase negativ)
- Enterokokkus spesies
- 5 Kandida albicans
- Acinetobakter anitratus
- Klebsielle pneumonia

10 Ilium ble bløtlagt i en løsning av 5% PVP-I (polyvinylpyrrolidon-Jodin, C15 kompleks fra GAF). Det ytre vev og fett ble fjernet og benet ble ført tilbake til 5% PVP-I for en total tid på en (1) time og benet ble undersøkt (ved fem gjentakelser) for restkontaminering. Følgende tabell viser en sammenligning av foreliggende fremgangsmåte med inkubasjoner i saltvannsløsning, den positive kontrollen, og basitrasin/polymyxin-blanding.

15	<u>Løsning</u>	Totale <u>mikroorganismer/ben</u>
	Forbehandling	8.700
	Etterbehandling	
	Saltvannsløsning	11.000
20	Antibiotikablanding	4.300
	5% PVP-I	330

Resultatene indikerer at 5% PVP-I er overlegen antibiotisk behandling ved reduksjon av antall infeksjonsdannende organismer.

25

Trinn 2: Rensing

Benet ble overført til en krukke med skrulokk inneholdende 1% (volum) oktylfenoksy-polyetoksyetanol, (Triton X-100®) ved 37°C og ristet kraftig i en malingspannrister (Modell nr. 0-5400-OM fremstilt av Red Devil) i 10 minutter. Etter overføring av benet
30 til en løsning av varm 1% Triton X-100®, ble benet inkubert over natten (ca. 15 til 18 timer ved 37 - 42°C) og ristet kraftig i 10 minutter. Benet ble overført til frisk 1% Triton X-100® og ristet kraftig igjen i 10 minutter. Eventuelt gjenværende marg ble fjernet ved spyling med sterilt vann.

35 Deretter ble benet plassert i en 3% hydrogenperoksid, ristet i 10 minutter og inkubert i en total tid på 60 minutter.

Det rensede benet ble vasket omhyggelig med sterilt vann ved spyling og gjentatte vaskinger inntil det ikke var noen rester av rensemiddelskum.

Trinn 3: Endelig dekontaminering

- 5 Det rensede benet ble plassert i en 1% PVP-I ved romtemperatur, ristet kraftig i 10 minutter og inkubert for en total tid på 30 minutter, og fjernet fra løsningen.

Trinn 4: Lagring

- Om ønskelig, kan PVP-I tørke på benet og gi benet en rik gylden farge og ytterligere beskyttelse mot infeksjonsdannende organismer. Det belagte benet kan deretter lyofiliseres. På samme måte, om ønskelig, kan benet belegges med PVP ved å la PVP tørke på benet.

EKSEMPEL 2

- 15 Trinn 1. Primær dekontaminering

Humant kne en bloc ble innsamlet av den lokale innsamlingsorganisasjonen, pakket og transportert på våt is til et benbehandlingslaboratorium.

- 20 Ved behandlingslaboratoriet ble kneet plassert i 1-5% PVP_I, 0.15 M natriumklorid i 10 til 60 minutter.

Trinn 2. Vevspreparering og rensing

Det følgende knevev med tilhørende benblokker blir fjernet:

- 25 - patella tendon
 - posterior krusiat ligament
 - anterior krusiat ligament
 - meniski

- 30 Stykkene ble trimmet for å fjerne overskuddsvev og fett. Ligamentet eller senen pakkes i et sterilt deksel (f.eks. plastomhylning eller sterile omhylninger) mens benblokkene renses ved spyling med varm (40-65°C) 1% Triton X-100® etterfulgt av omhyggelig rensing med sterilt vann eller valtvannsløsning.

Trinn 3. Endelig sterilisering

Vevene plasseres i 1% PVP-I, 0.15 M natriumklorid, forsiktig ristet i 1 time ved romtemperatur og renses omhyggelig med sterilt vann eller saltvann. Hvert stykke blir kryopreservert, pakket og lagret i flytende nitrogen.

5

EKSEMPEL 2 (Supplement)

Det er funnet at med hensyn til anvendelse av Triton X-100® i trinn 2 i eksempel 2, er 0.1% den foretrukne konsentrasjonen derav.

10 EKSEMPEL 3

Trinn 1. Primærdekontaminering

Humane diafysialben ble innsamlet av den lokale innsamlingsorganisasjonen, pakket og transportert på våt is til et benbehandlingslaboratorium.

- 15 Benbehandlingslaboratoriet plasserte benene i 5% PVP-I, 1% Triton X-100® i 10 til 60 minutter.

Trinn 2, Vevspreparering og rensing

Benene ble skrapet for å fjerne overskuddsvevet og fett, plassert i en 1% PVP-I, 1%

- 20 Triton X-100®. Deretter ble benene ytterligere renses ved skylling og inkubering i varm (40-65°C) 1% Triton X-100® etterfulgt av omhyggelig rensing med sterilt vann.

Benene ble malt til biter i en benmølle, vasket med sterilt vann og lyofilisert. Bitene ble malt til en finere størrelse i en Tekmarmølle.

25

Trinn 3. Demineralisering

Benpulveret ble demineralisert med kald 0.6 N saltsyre, og vasket med sterilt vann.

Trinn 4. Endelig sterilisering

- 30 Det demineraliserte pulveret ble plassert i 1% PVP-IU i 1 time, vasket omhyggelig med sterilt vann. Pulveret ble overført til ampuller, lyofilisert, pakket og lagret ved romtemperatur.

EKSEMPEL 4

- 35 Endelig sterilisering med inaktivering av PVP-I

Et ben, tilsvarende behandlet som benet i eksempel 1, ble plassert i 20 ml 1% PVP-I, og inkubert i 1 time. Etter inkuberingen, ble det tilsatt 0,132 ml 0,91 natriumaskorbat.

Løsningen ble nesten umiddelbart klar og etter 10 minutter hadde benfargen gått tilbake til sin naturlige off-white farge.

EKSEMPEL 5

- 5 Dette eksemplet sammenligner resultatene ved høytrykks/forhøyet temperatur rensemiddelrensemetoden med det som oppnås ved standardmetoder. Etter rensing blir femoralhodene splittet for bedre å vise rensegraden.

10 Femoralhodet vist til høyre (figur 5) ble inkubert ved 60°C i 1% (volum) Tween 80 i 2 dager med periodisk 10 minutts omrøring ved å anvende en malingboksriste (modell nr. 0-5400-OM fremstilt av Red Devil). Femoralhodet ble deretter spylt med varmt vann, inkubert i 3% hydrogenperoksid i 20 minutter og deretter spylt igjen med varmt vann for å fjerne hydrogenperoksidet.

- 15 Femoralhodet vist til venstre ble renset i henhold til standardmetoder. Det ble spylt med 60°C vann i 15 minutter; inkubert i 3% hydrogenperoksid i 15-20 minutter; igjen spylt med 60°C vann for å fjerne hydrogenperoksid; inkubert i 70% etanol i 1 time; og igjen spylt med 60°C vann for å fjerne etanolen. Figur 5 er et fotografi av de rensede benene.

EKSEMPEL 6

Behandling av humant femur med en atmosfære ved mindre enn omgivende trykk

- Et femur fra en human donor ble skrapet og skåret ca. 15 cm fra den distale enden. Det distale partiet ble plassert i en vakuumsikator i en oppadstående posisjon, slik at hodet til femur var øverst og skaftet var nederst. Et undertrykk (tilnærmet 25 tommer Hg, 25 resulterte i et kammertrykk på 0.15 atmosfærer) ble påført i 1 time ved å anvende en kommersiell vakuumpumpe (Gast, modell DOA-P104-AA). Temperaturen til benet var 20 til 25°C under denne prosedyren. Tilnærmet 37 ml lipid ble oppsamlet.

- 30 Benet ble deretter vasket og plassert i en vandig løsning av 0.1% Triton X-100® ved 60°C og ble deretter rørt kraftig i 10 minutter med en rører (en kommersiell malingrører, Red Devil modell 5400-CM). Inkuberingen ble fortsatt ved 60°C i ca. 3 timer. Benet ble deretter renset med sterilt vann.

EKSEMPEL 7

- 35 Anvendelse av en atmosfære ved et trykk mindre enn omgivende trykk for å fremme fortrengningen av fjernbart materiale fra den indre matrixen til flere benprøver

Humant ben ble skrapet og skåret i stykker innbefattende en proksimal femur, proksimal tibia, kanselløse tapper og iliumkiler. Benprøvene ble deretter inkubert i 5% jodoform (PVP-I, som tidligere nevnt, BASF produkt 30/06) i 50 minutter, etterfulgt av overføring til og inkubering i 1% av ovennevnte jodoform for mellom 30 og 60 minutter. Hull
 5 (sylindriske 1 mm x 10 mm) ble deretter boret i femur og tibiastykkene som vist i figurene 1-4 (tapper unntatt). Alle stykkene ble deretter plassert i en vakuumsikator slik at benprøvene var plassert i denne over en mottaksbeholder for lipidene. Vakuum ble deretter påført i 1 time ved bruk av en Gast-modell DOA-P104-AA pumpe som resulterte i et kammertrykk på 25 tommer Hg (0.16 atmosfærer), hvor benet ble holdt
 10 ved ca. 23°C. Tilnærmet 37 ml lipid og 7.5 ml blod ble oppsamlet.

EKSEMPEL 8

Anvendelse av et trykk lavere enn omgivende trykk for å fremme fortrenghing av fjernbart materiale fra en iliumkile

15 En iliumkile fremstilt i henhold til prosedyren i eksempel 7 (lengde ca. 1.5 tommer, 0.75 tommer over siden) ble forvarmet i 1 time i en løsning av 0.1% Triton X-100® i vann ved 60°C, med en tilfeldig svak risting, og deretter overført til et 50 ml oppsamlingsrør. Vakuum ble påført (620 mm Hg) i 80 minutter, noe som førte til et kammertrykk på 0.15 atmosfærer, (hvor temperaturen til benet ble opprettholdt ved 23°C). Tilnærmet 0.8 ml
 20 lipid ble oppsamlet over en tidsperiode på 30 minutter.

EKSEMPEL 9

Behandling av humane femurbenprøver

For denne prosedyren ble prøver av høyre og venstre distale femurer fra en human donor
 25 skåret ca. 5.5 tommer fra de distale endene derav. Høyre side femurprøve ble behandlet ved den kjente prosessen beskrevet over ved anvendelse av polymyxin/basitrasinløsning, mens venstre side femurprøve ble behandlet ved den virale inaktiveringsprosessen beskrevet direkte under (se også eksempel 1).

30 Den venstresidige prøven av benet ble bløtet i 5% jodoformløsning, (5% PVP-I, BASF produkt 30/06), i tilnærmet 1 time, og deretter overført til ½ liter volum av en frisk jodoformløsning (1% PVP-I, BASF produkt 30/06) i ca. 1 time, hvorefter det ble skrapet. Tilnærmet 5 hull (1-2 mm brede og 10-20 mm dype) ble deretter boret gjennom både det kortikale og også det kanselløse benområdet derav som vist i figur 4.

35

Etter rensing med varmt vann og tørking, ble benet anbragt i en vakuumsikator og tilnærmet 26 mm Hg vakuum ble påført ved bruk av en gassmodell DAA-V175-E8

pumpe i 30 minutter, noe som medførte et trykk over benet på 0.132 atmosfærer. Temperaturen til benet var tilnærmet 23 til 35°C eller litt varmere. Tilnærmet 30 ml lipid ble fjernet ved vakuumbehandlingen.

- 5 Etter vasking med varmt vann i 5 minutter, ble benet deretter plassert i en 0.1% surfaktantløsning, og rørt som i eksempel 8 i 10 minutter. Frisk surfaktantløsning ble deretter tilsatt og behandlingen ble gjentatt inntil løsningen var tilnærmet klar. Benet ble deretter inkubert med et ytterligere volum av surfaktantløsning i tre timer ved 60°C. Etter en rensing med vann, ble benet overført for 5-15 minutter til en vandig løsning av
- 10 3% peroksid, og deretter vasket med vann. Det rensede benet ble deretter overført til en 1% jodoforløsning (PVP-I) i en time, vasket med vann, hvorefter beholderen ble fylt med vann. Et reduksjonsmiddel, natriumtiosulfat, ble tilsatt for å omdanne eventuelt gjenværende jod til jodid og benet ble vasket omhyggelig med vann for lagring.
- 15 For å sammenligne det transplanterbare benet i henhold til oppfinnelsen med det som ble fremstilt ved tradisjonelle metoder, ble den høyre siden i feburprøven behandlet, som tidligere nevnt, i henhold til den kjente polymyxin/basitrasinprosessen. Den høyresidige femurprøven ble derved skrapet og plassert i en beholder med varmt vann. Beholderen var håndrørt, det lipidholdige vannet ble kastet og friskt, varmt vann tilsatt. Prosessen
- 20 ble gjentatt inntil mengden av lipid i vannet var minimal (ca. 0.5 timer). Benet som var resultatet av denne tradisjonelle prosessen, beholdt karakteristisk bevis på et lavere nivå av klinisk anvendelighet, for eksempel en rødbrun farge på grunn av blodrester og oljerester på grunn av lipidrester.

25

EKSEMPEL 10

Demonstrasjon av blod og lipidstrøm fra et femur som en funksjon av atmosfærisk trykk (mindre enn omgivende)

- 30 Det effektive atmosfæriske trykket ble bestemt for et enkelt benstykke (distal humant femur med hull på 1 til 2 mm boret som vist i figur 4). Det ble brukt en håndvakuumpumpe for å senke lufttrykket i inkrementer på 63,5 mm Hg (ca. 0.08 atmosfærer hver). Benet ble holdt ved vakuuminstilling i 5 minutter og antallet blod og/eller lipid-dråper ble bestemt for hver tidsperiode. Resultatene er vist i tabellen.

35

Vakuum (mm Hg)	% atmosfære	Volum (dråper/5 min.)	Dråpe- karakteristikk
0	1.0	3	
63,5	0.92	2	Kun blod
127		4	Kun blod
190,5		1	Kun blod
254	0.66	5	2 lipid + 3 blod
317,5		8	Kun lipid
381		11	Kun lipid
444,5		18	"
508		28	"
571,5		38	"
635	0.16	82	"

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for preparering av ben for transplantasjon, hvilket ben inneholder en indre matrix som i seg selv består av fjernbart materiale, k a r a k t e r i - s e r t v e d a t :

- (a) benet eller matrixen bringes i kontakt med en løsning som innbefatter et rensmiddel eller et dekontamineringsmiddel,
- 10 (b) benet bringes i kontakt med en atmosfære som har et trykk mindre enn omgivende trykk, og
- (c) benet eller matrixen bringes i kontakt med en løsning som innbefatter et rensmiddel eller et dekontamineringsmiddel.

2.

15 Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det benyttes dekontamineringsmiddel som har evnen til å inaktivere en eller flere spesier eller grupper av bakterier, fungi, virus, prioner eller parasitter.

3.

20 Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at benet utsettes for en høytrykksvaskebetingelse før eller etter kontakt med atmosfæren.

4.

25 Fremgangsmåte i henhold til krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at høytrykksvaskebetingelsene innbefatter vasking med en væskestrøm med høy hastighet.

5.

30 Fremgangsmåte i henhold til krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at høytrykksvaskebetingelsene innbefatter kraftig omrøring.

6.

Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at benet utsettes for forhøyet temperatur før, under eller etter kontakt med atmosfæren.

7.

Fremgangsmåte i henhold til krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den forhøyede temperaturen er mellom 37 og 80°C.

5 8.

Fremgangsmåte i henhold til krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den forhøyede temperaturen er mellom 50 og 65°C.

9.

10 Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at dekontamineringsmidlet velges fra gruppen bestående av etylalkohol,
hydrogenperoksid, klorheksidin, hypokloritt og en jodofor.

10.

15 Fremgangsmåte i henhold til krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d
at midlet er en jodofor.

11.

Fremgangsmåte i henhold til krav 10, k a r a k t e r i s e r t
20 v e d at jodoforen er polyvinylpyrrolidon jodin med en molekylmasse på mindre enn
ca. 100.000.

12.

Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
25 at kontakten med atmosfæren og matrixen fremmes ved boring av et eller flere hull i
benet.

13.

Fremgangsmåte i henhold til krav 12, k a r a k t e r i s e r t
30 v e d at hullet eller hullene bores i et område av benet som bærer minimal vekt.

14.

Fremgangsmåte i henhold til krav 13, k a r a k t e r i s e r t
v e d at hullene har en diameter på mellom 0.5 mm og 3 mm.

15.

Fremgangsmåte i henhold til krav 14, k a r a k t e r i s e r t
v e d at hullene er mellom 10 og 30 mm dype.

5 16.

Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at atmosfæren har et trykk på ca. 0.7 atmosfærer eller mindre og holdes i kontakt med
benet mellom 2 minutter og 5 timer.

10 17.

Fremgangsmåte i henhold til krav 16, k a r a k t e r i s e r t
v e d at atmosfæren har et trykk på 0.3 atmosfærer eller mindre, og holdes i kontakt
med benet for mellom 30 og 60 minutter.

15 18.

Fremgangsmåte i henhold til krav 17, k a r a k t e r i s e r t
v e d at atmosfæren har et trykk på 0.2 atmosfærer eller mindre og holdes i kontakt
med benprøven for 30 og 60 minutter.

20 19.

Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d
at fremgangsmåten fremmer inaktivering av virus.

20.

25 Fremgangsmåte ved behandling av indre matrix til ben som inneholder en forutbestemt
mengde fjernbart materiale, hvilken matrix også inneholder en forutbestemt mengde lipid
som i vesentlig grad immobiliserer det fjernbare materialet, k a - r a k -
t e r i s e r t v e d at matrixen behandles ifølge fremgangsmåten som
angitt i krav 1, der matrixen blir holdt i kontakt med atmosfæren med et trykk lavere enn
30 omgivende trykk over en tidsperiode effektiv til å redusere lipidinnholdet under den
forutbestemte mengden derav.

21.

35 Ben passende for transplantasjon i en pasient, k a r a k t e r i s e r t v e d at
det er fremstilt i henhold til fremgangsmåten ifølge krav 1.

FIG. 1

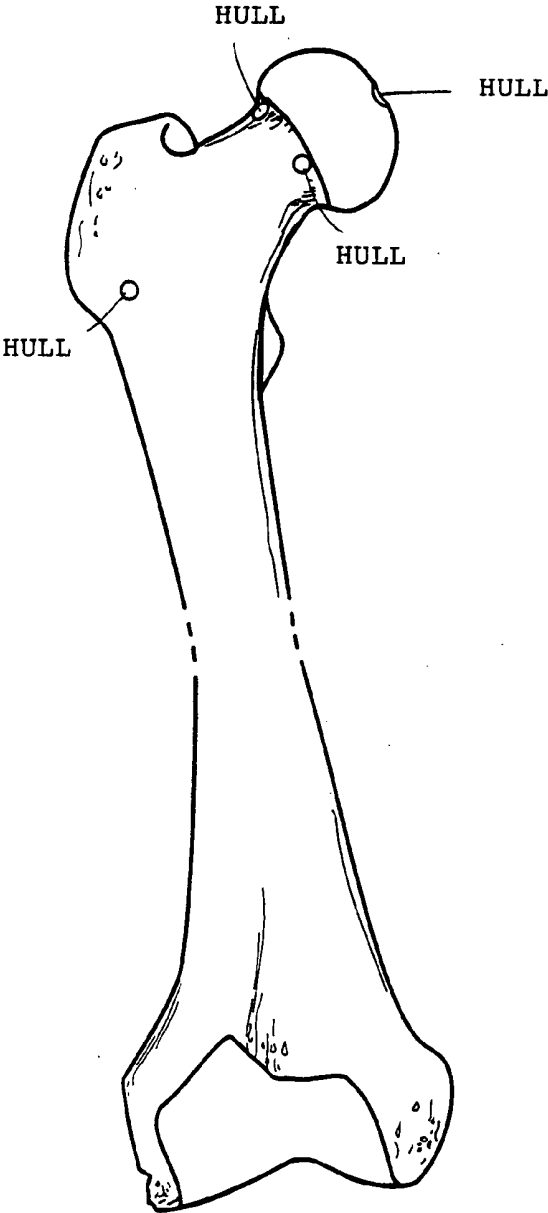


FIG. 2A

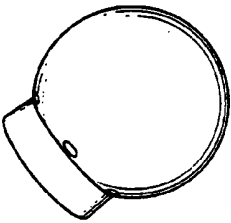


FIG. 2B

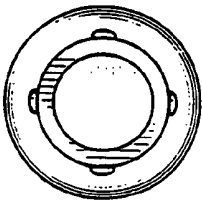


FIG. 4

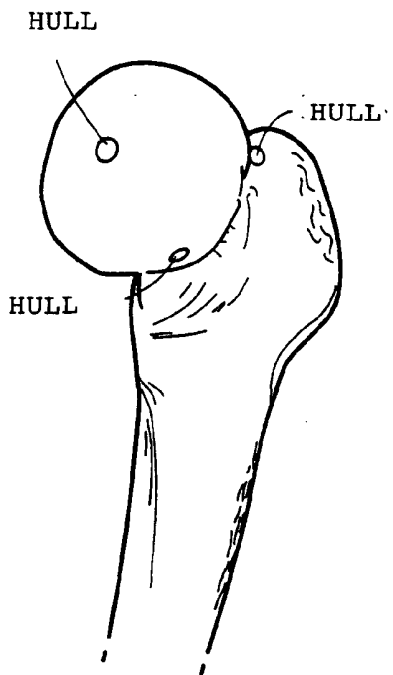
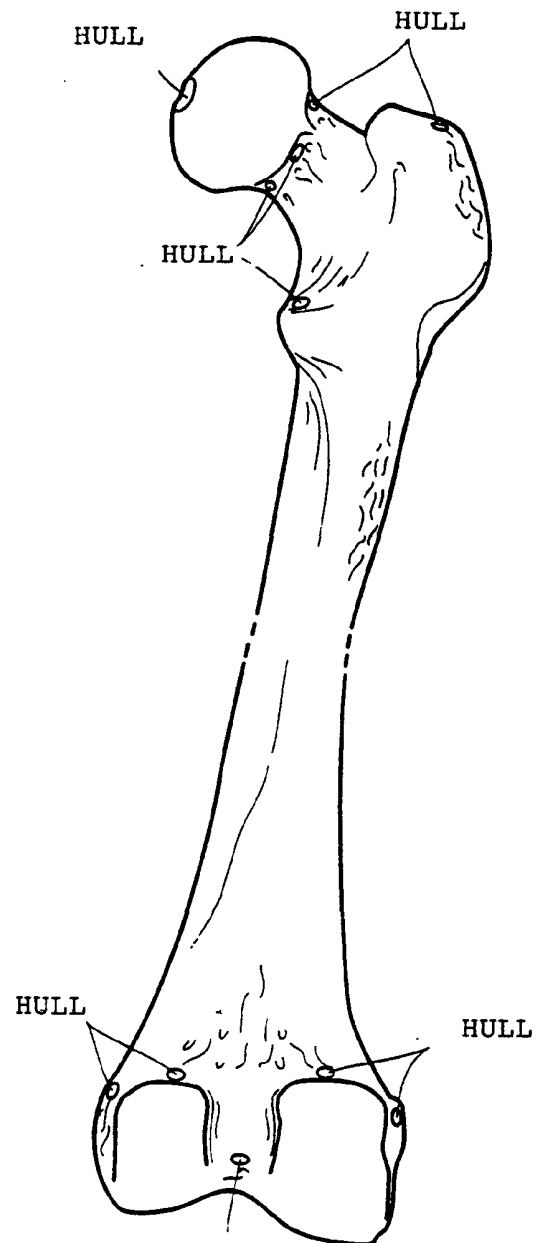


FIG. 3

FIG. 5

