

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 281 980**

⑯ Int. Cl.:

A61L 2/00 (2006.01)

A61L 2/025 (2006.01)

A61L 101/02 (2006.01)

A61L 101/06 (2006.01)

A61L 101/20 (2006.01)

A61L 101/22 (2006.01)

A61L 101/32 (2006.01)

A61L 101/34 (2006.01)

A61L 101/36 (2006.01)

A61L 101/38 (2006.01)

A61L 101/40 (2006.01)

A61L 101/54 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **99967099 .5**

⑯ Fecha de presentación : **08.11.1999**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1128849**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2001**

⑯ Título: **Procedimiento para reagrupar tejidos.**

⑯ Prioridad: **13.11.1998 US 191232**
20.08.1999 US 378527
07.09.1999 US 390174

⑯ Titular/es: **Regeneration Technologies, Inc.**
1 Innovation Drive
Alachua, Florida 32615, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOP: **01.10.2007**

⑯ Inventor/es: **Mills, C., Randal;**
Wironen, John, F.;
Hanstke, Sean;
Donda, Russel, S.;
Grooms, Jamie, M. y
Bianchi, John, R.

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **01.10.2007**

⑯ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Procedimiento para reagrupar tejidos.

5 **2.0 Antecedentes de la invención**

2.1 Campo de la invención

La presente invención es un método nuevo para reagrupar tejido. El procedimiento de la presente invención incluye 10 las etapas de perfundir un implante poroso que logra una interpenetración eficaz de factores deseados en los poros o canales del implante, limpiar el implante, y pasivar eficazmente el implante (inactivar patógenos, microorganismos, células, virus, y similares, y reducir su antigenicidad). La presente invención también proporciona un aparato para realizar el procedimiento anterior.

15 *2.2 Descripción de procedimientos conocidos para el tratamiento de implantes*

Como se utiliza en la presente descripción, el término “implante” se refiere a cualquier material cuya implantación en un ser humano o en un animal se considera que es beneficiosa. En consecuencia, el implante puede ser un material derivado de tejido, tal como hueso, piel, y similar, o puede ser un material metálico o sintético que tiene una estructura 20 interna que puede requerir la limpieza o la esterilización. El implante puede comprender tejido de aloinjerto, tejido de xenoinjerto, o sus combinaciones, y, en el caso de tejidos mineralizados, tales como hueso, el implante puede comprender tejido mineralizado, tejido parcialmente desmineralizado, tejido completamente desmineralizado, y sus combinaciones. Teniendo esta definición en mente, será manifiesto qué procedimientos se han descrito en la técnica 25 para el tratamiento de implantes para limpiar tal implante, inactivar microorganismos o células contaminantes que puedan estar presentes en o sobre tal implante, o para infundir el implante con factores deseables. Esta sección de la descripción describe varios métodos conocidos para lograr uno o más de estos resultados, a fin de exponer de forma más clara y definitiva lo que se ha inventado, y lo que se describe y reivindica como nuevo e inventivo, según se define mediante las reivindicaciones anexas aquí.

30 La solicitud de patente europea nº EP 0.424.159 (Osteotech) - “Aseptic Processing of Allograft Bone and Tissue” (publicada el 24 de abril de 1991, basada en la Solicitud de prioridad US presentada el 19 de octubre de 1989) es una descripción extremadamente general que se refiere al tratamiento aséptico de hueso y tejido de aloinjerto.

La patente US nº 5.333.626 (Cryolife) - “Preparation of Bone for Transplantation”, se refiere a un método para 35 preparar hueso para transplante manteniendo la matriz interna del hueso a transplantar, preferentemente a alta presión, en presencia de un agente descontaminante, preferentemente polivinilpirrolidona-yodo (PVP-I), opcionalmente en presencia de un detergente, en disolución. La característica de “alta presión” de esta patente se describe en la columna 5, líneas 10-31: “las condiciones de lavado a alta presión deben proporcionar una fuerza suficiente para llevar a la disolución limpiadora al interior de la matriz interna del hueso. Tales condiciones de lavado a alta presión incluyen, 40 por ejemplo, agitación vigorosa, tal como con un agitador de bote de pintura, o un lavado a alta presión tal como con una corriente de chorro líquida a alta presión... La presión de la corriente de chorro líquida es preferentemente 100 hasta 3.000 psi, y lo más preferible 500 hasta 1.500 psi”. Sin embargo, la patente no describe ni sugiere la exposición de un implante a una presión atmosférica oscilante, la patente citada requiere presiones significativamente mayores que las requeridas según la presente invención, y sólo es aplicable al hueso, mientras que la presente invención es 45 aplicable a hueso o a tejido blando. Además, el procedimiento reivindicado requiere aproximadamente 1-2 días para completarlo.

La patente US nº 5.513.662 (Osteotech) - “Preparation of Bone for Transplantation”, se refiere a un método para 50 preparar hueso para transplante, en el que la matriz interna del hueso se mantiene a una presión por debajo de una atmósfera. Se describe (columna 10, líneas 13-19) que “los tiempos óptimos para mantener la presión por debajo de la presión ambiente oscilan generalmente en el intervalo de 30 hasta 60 minutos, pero se pueden determinar para cada aplicación monitorizando el transcurso de la extracción de sangre y de lípidos (véase el Ejemplo 10)”. Se describe además que generalmente el uso de una presión de gas por debajo de la presión ambiental, durante menos de dos minutos, 55 será ineficaz, y que el uso durante un tiempo más prolongado que cinco horas no conferirá ningún beneficio adicional. De este modo, la patente 5.513.662 requiere que el hueso se mantenga durante períodos de tiempo sustanciales, a presiones por debajo de una atmósfera. No hay ninguna descripción ni sugerencia de un ciclo rápido entre presiones elevadas y reducidas, incluso aunque se sugiere que el hueso se puede tratar primero a una presión elevada, seguido de una etapa de tratamiento a una presión por debajo de la presión atmosférica (véase, por ejemplo, la reivindicación 3, columna 15). La presente invención describe un procedimiento en el que la exposición transitoria y cíclica de un 60 material de implante a una presión dada logra el resultado deseado de limpiar, perfundir o pasivar el implante.

La patente US nº 5.556.379 (LifeNet Research Foundation) - “Process for Cleaning Large Bone Grafts and Bone Grafts Produced Thereby”, describe el proceso “Allowash®”. La patente está dirigida explícitamente a eliminar 65 “médula ósea de los espacios óseos cavernosos y de estructura porosa en grandes injertos óseos, esencialmente completos”. (Véase el Sumario de la Invención). En consecuencia, la patente citada está dirigida sólo al tratamiento del hueso, que ha de estar intacto en gran parte. La intención expuesta, al aplicar el procedimiento a injertos óseos esencialmente completos, es reducir la carga de virus potencial que tiene la médula ósea, para facilitar la preparación de injertos óseos más pequeños a partir de aquellos. El procedimiento implica aplicar vacío al injerto óseo para extraer

una disolución capaz de solubilizar la médula ósea a través de superficies cartilaginosas que se articulan, y a través del canal intramedular del hueso intacto, o de otra cavidad ósea. La patente no describe ni sugiere un método en el que se usen presiones oscilantes para limpiar un injerto óseo.

5 La patente US nº 5.380.826 (Aphios Corporation) - "Supercritical Fluid Disruption of and Extraction from Microbial Cells", se refiere a un método para cosechar componentes intracelulares exponiendo las células a una presión elevada en presencia de un disolvente, y liberando entonces rápida y repentinamente la presión para efectuar la destrucción de las células. La patente también describe un aparato para realizar continuamente este procedimiento. Sin embargo, esta patente no describe ni sugiere la aplicación del método de destrucción celular a hueso de aloinjerto.

10 10 La patente US nº 5.288.462 (Stephen D. Carter) - "Sterilization Apparatus and Method", describe una cámara para recibir un material a esterilizar sometiendo repetidamente la cámara a presiones elevadas, seguido de una liberación repentina de la presión, es decir, "descompresión explosiva". La patente requiere que la cámara esté a una presión de por lo menos 1000 psi.

15 15 La patente no describe, ni sugiere ni reivindica, la aplicación de este método o de la cámara a la esterilización de materiales óseos. No hay ninguna descripción de disoluciones limpiadoras usadas en relación con el aparato descrito que fuesen eficaces para esterilizar la matriz de un hueso. No hay ninguna descripción que permitiese a la persona experta en la técnica determinar, sin experimentación indebida, que el hueso se podría esterilizar en este aparato.

20 20 Además, no hay ninguna descripción ni sugerencia de que un implante se podría esterilizar sin el uso de tales presiones muy elevadas, sino simplemente mediante la oscilación de presiones absolutas más bajas.

25 La patente US nº 5.725.579 (Bioland) - "Process for Treating Bone Tissue and corresponding Implantable Biomaterials", se refiere a un método para limpiar hueso exponiendo el hueso a un fluido supercrítico. Según la mejor manera de entender esta patente, esto implica exponer el hueso a dióxido de carbono a presiones elevadas, a fin de solubilizar los líquidos.

30 Los métodos de esterilización de tejidos, conocidos en la técnica, tienen atributos indeseables. La radiación gamma, a fin de asegurar la destrucción de patógenos, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha de usar a dosis que dan como resultado la destrucción del tejido (por ejemplo, 3,5 Mrad; véase, por ejemplo, Rasmussen, *et al.*, J. Arthroscopic and Related Surgery, **10**(2):188-197, (1994); Goertzen, *et al.*, British Soc. of Bone and Joint Surg., **77**:204-211 (1005); Loty, *et al.*, International Orthopaedics, **14**:237-242, (1990)). Se ha encontrado que el uso de óxido de etileno da como resultado implantes que producen respuestas inflamatorias (Kudryk, *et al.*, J. Biomedical Materials, **26**:1477-1488, (1992); Thoren, *et al.*, Clin. Orthopaedics, **318**:259-263, (1995); Simonian, *et al.*, Clin. Orthopaedics, **302**:290-296, (1994); Jackson, *et al.*, Am. J. Sports Medicine, **18**:1-9, (1990)). Los tratamientos con disoluciones químicas estándares, aunque eficaces a la hora de esterilizar superficies con las que las disoluciones se ponen en contacto, tienen la principal desventaja de no ser suficientemente penetrantes para alcanzar los intersticios de los tejidos, donde pueden residir organismos potencialmente patógenos. En vista de estos defectos, sigue existiendo una necesidad largamente sentida de un procedimiento de esterilización de tejidos optimizado, que incorpore algunas o 40 todas las características siguientes: la eliminación o inactivación eficaz de un amplio intervalo de patógenos bacterianos y víricos; la ausencia de toxicidad del injerto; la retención de características deseables de los tejidos, tales como resistencia biomecánica o propiedades de inducción del crecimiento; eficacia a lo largo de un amplio intervalo de modificaciones de funcionamiento, y para una amplia variedad de tipos de tejidos; la capacidad para concluir el procedimiento en un recipiente para tejido de implante final, para asegurar un envasado estéril y el suministro para la 45 implantación.

50 A la vista del repaso anterior de la técnica conocida que se refiere a los métodos de tratamiento y esterilización de implantes, se cree que la presente invención proporciona una mejora largamente sentida por cuanto no se requieren temperaturas o presiones absolutas para lograr la limpieza, perfusión o pasivación eficaces del implante. Además, el actual método no requiere perforar orificios en materiales de implante, ni ninguna otra manipulación o modificación, a fin de lograr una limpieza y esterilización eficaces del implante. Además, el presente método permite reunir de forma segura tejido de donante para la producción de implantes a economías de escala, sin al mismo tiempo disminuir las propiedades biológicas deseables de los materiales de implante reunidos. El procedimiento actual incluye un número de metodologías, cuyo efecto aditivo es la producción de tejidos muy limpios, esterilizados (pasivados), que se pueden 55 implantar, sin provocar toxicidad al receptor. Diversas realizaciones del método de la presente invención incluyen todas las características enumeradas anteriormente, a saber: la eliminación o inactivación eficaz de un amplio intervalo de patógenos bacterianos y víricos; la ausencia de toxicidad del injerto; la retención de características deseables del tejido, tal como resistencia biomecánica o propiedades inductoras del crecimiento; la eficacia a lo largo de un amplio intervalo de modificaciones de funcionamiento, y para una amplia variedad de tipos de tejidos; la capacidad para concluir el procedimiento en un recipiente para tejidos de implantes final, para asegurar el envasado estéril y el suministro para la implantación. Además, en ciertas realizaciones, se infunden en los implantes factores osteogénicos, factores condrogénicos, antibióticos, antineoplásicos, antiinflamatorios, u otros agentes biológicamente activos, o combinaciones de tales agentes. En una forma de realización específica, el agente infundido es una proteína morfogénica ósea. En otra forma de realización específica, el agente infundido es un ácido nucleico que codifica activamente un factor osteogénico, condrogénico u otro factor de crecimiento. Dada la definición del término "implante" como se usa aquí, los 60 expertos en la materia apreciarán que un implante según la presente invención puede comprender tejido de aloinjerto, tejido de xenoinjerto, o sus combinaciones. De este modo, debido a las mejoras del presente método, se puede combinar tejido procedente de diferentes donantes, y de hecho se pueden combinar tejido animal y tejido humano tratados 65

según los métodos de la presente invención, para formar un implante. En el caso de tejidos mineralizados, tales como hueso, el implante puede comprender tejido mineralizado, tejido parcialmente desmineralizado, tejido completamente desmineralizado, y sus combinaciones. Como se conoce en la técnica, hay una variación sustancial en las propiedades inductoras de huesos de diferentes preparaciones de matriz ósea desmineralizada (DBM) procedente del mismo 5 donante, e incluso diferencias más amplias cuando la DBM, ya sea en forma de polvo o de otra forma, deriva de donantes diferentes. Los expertos en la materia apreciarán, a partir de la presente descripción, que es posible, mediante los métodos descritos aquí, reunir diversas preparaciones de DBM para lograr lotes de DBM de calidad y capacidad inductora de hueso consistentes.

10 3.0 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento mediante el cual se combina de forma segura tejido procedente de uno o más donantes con tejido procedente de uno o más donantes diferentes. El aloinjerto se puede combinar con xenoinjerto o sus combinaciones, según el método de la presente invención. Además, la presente invención permite la 15 producción de lotes reunidos de tejido con propiedades consistentes y fácilmente reproducibles, debido a la mezcla de las propiedades de tejidos procedentes de donantes diferentes.

En el procedimiento de la presente invención, se crea una oscilación de presión en una cámara que contiene un 20 material de implante, en presencia de diversas disoluciones limpiadoras (0,5% de fosfato de tri(n-butilo), TNBP; peróxido de hidrógeno, y similar). El procedimiento comprende esencialmente las siguientes etapas, suponiendo que se use como material de partida un material metálico o sintético que tiene una matriz o espacio interno, o un material de injerto limpio (desprovisto de otro material), que puede haber sufrido o no un tratamiento inicial con maquinaria:

- 25 1. evacuar rápidamente la cámara que contiene el material de implante, de aloinjerto o de xenoinjerto;
2. llenar nuevamente de forma rápida la cámara con disoluciones limpiadoras - por ejemplo, mezclas de H_2O_2 /Triton X-100/TNBP/Betadine;
- 30 3. presurizar la cámara;
4. llevar a cabo rápidamente ciclos entre las etapas (1) y (3), entre aproximadamente 1-150 ciclos, manteniendo una temperatura entre aproximadamente 35-40 grados centígrados, con aplicación opcional de energía ultrasónica;
- 35 5. trabajar por medio de una máquina el producto, según se deseé, si no se ha trabajado previamente por medio de una máquina;
6. repetir las etapas (1)-(4) usando las mismas composiciones limpiadoras, o diferentes, opcionalmente a temperatura elevada o reducida; y
- 40 7. opcionalmente realizar una etapa de descontaminación de la superficie, preferentemente en el envasado final, como en la exposición a tratamientos de descontaminación de superficies con H_2O_2 en fase de vapor, o similares, conocidas en la técnica.

45 Las presiones absolutas del sistema no parecen ser extremadamente críticas para lograr la limpieza profunda y penetrante de los materiales de implante o de injerto. Más bien, es la velocidad del ciclo de presiones, el hecho de la ciclación, y posiblemente la amplitud del ciclo de presiones, lo que parece que es crítico para el éxito de este método. En consecuencia, todo el procedimiento se puede realizar de forma exitosa a presiones por encima o por debajo de una atmósfera. Son adecuadas presiones de evacuación de 25 pulgadas (63,5 centímetros) de mercurio a la presión de 50 vapor de las disoluciones en la cámara. También son adecuadas presiones de retrollenado de entre aproximadamente 40 y 100 psi. En una forma de realización, todo el procedimiento se realiza en una cámara que permite el tratamiento con ultrasonidos de los contenidos durante todas las etapas o en etapas particulares del procedimiento. Preferentemente, cuando se va a infundir un ácido nucleico en el implante, esto se lleva a cabo en ausencia de ultrasonidos, lo que podría destruir el ácido nucleico. Además, de forma preferible, todo el procedimiento se realiza en un sistema programable bajo control con un circuito lógico programable o por ordenador, de forma que se minimiza el tratamiento 55 manual, y se maximiza la reproducibilidad del procedimiento. Cuando el tejido tratado es un implante óseo o cualquier forma de tejido de aloinjerto o de xenoinjerto, la elección de disolventes apropiados, tal como urea (preferentemente aproximadamente 6 M), o de otros reactivos caotrópicos (por ejemplo, hidrocloruro de guanidina 4 M, o similar), tiene la ventaja adicional de producir un tejido tratado de una antigenicidad incluso menor que si no se incluyese tal 60 tratamiento. Las metas de descontaminación para este procedimiento incluyen:

- una reducción de entre aproximadamente uno (1) y doce (12) del log en la contaminación bacteriana
- 65 • una reducción de entre aproximadamente uno (1) y quince (15) del log en la contaminación de virus con cubierta
- una reducción de hasta aproximadamente cinco (5) del log en la contaminación con virus sin cubierta

- una reducción de entre aproximadamente dos (2) y diez (10) veces en endotoxina
- el mantenimiento de propiedades biológicas y biomecánicas del implante o del injerto
- 5 • la ausencia de toxicidad del tejido, debido a las disoluciones limpiadoras usadas
- la antigenicidad reducida del implante.

10 Tales tratamientos y resultados deseables también se pueden aplicar al tratamiento de tejido enfermo que se puede cosechar, tratar *ex vivo* y reimplantar.

15 En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para reunir segura, eficaz y eficientemente tejido procedente de uno o más donantes con tejido procedente de uno o más donantes adicionales, para el implante subsiguiente en un receptor que lo necesite.

15 La presente invención permite la producción de implantes de aloinjerto, de autoinjerto, de xenoinjerto, metálicos o sintéticos, seguros y eficaces, de manera económica y eficiente.

20 La presente invención también permite reunir de forma segura fuentes de donantes de tejidos para la producción de implantes, a la vez que permite minimizar el riesgo de que cualquier donante contaminado individual contaminará cualquier otro tejido de donante o cualesquiera receptores del tejido reunido, tratado según el método de la presente invención.

25 La presente invención permite limpiar, perfundir o pasivar materiales de implantes sin, al mismo tiempo, comprometer las propiedades biológicas deseables de los materiales de implante de partida.

La presente invención permite producir materiales de implante con antigenicidad reducida.

30 La presente invención permite proporcionar implantes perfundidos con sustancias deseables biológicamente activas, incluyendo pero sin limitarse a ácidos nucleicos, factores de crecimiento, antibióticos y similares.

35 La presente invención permite proporcionar implantes que comprenden aloinjerto, xenoinjerto, o sus combinaciones, que se han tratado para hacer que la reunión de tales tejidos sea segura para su implantación en un receptor de los mismos.

35 Mediante el método de la presente invención, se logran propiedades de implantes de tejidos consistentes por medio de la reunión de tejidos procedentes de los mismos donantes o de donantes diferentes, incluyendo matriz ósea desmineralizada y similar.

40 La presente invención también se refiere a un aparato y a una instalación para el procedimiento, adecuados para llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 1.

45 Otras ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de un repaso de la descripción completa, incluyendo las reivindicaciones adjuntas.

4.0 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A proporciona una representación esquemática en la que se muestra el procedimiento de pasivación por perfusión cíclica de la invención a través de siete ciclos, mientras que la figura 1B muestra la exposición cíclica de presión y de fluido a la que se someten los materiales del implante tratados según el método de la presente invención.

50 La figura 2 muestra una representación esquemática de una forma de realización de un aparato que se puede emplear para efectuar el método según la presente invención.

55 La figura 3 muestra una representación esquemática de una forma de realización adicional de una disposición de un aparato para realizar el método según la presente invención.

60 La figura 4 proporciona un organigrama global de las diversas etapas del tratamiento de un implante según el procedimiento de pasivación mediante perfusión cíclica de la presente invención, desde la adquisición del tejido del donante hasta el envasado final del producto estéril.

La figura 5 proporciona una forma de realización de una disposición detallada de contención del tratamiento para llevar a cabo el método según la presente invención.

65 La figura 6 es una fotografía de un húmero entero después de ser tratado según el método de la presente invención; una sección en corona, después de limpiarla, a través de la cabeza del húmero, revela la limpieza de la matriz ósea interna.

ES 2 281 980 T3

La figura 7 es una fotografía de una rodilla intacta, incluyendo la tibia próxima, el fémur distante y la rótula, junto con tendones y ligamentos de la articulación, antes del tratamiento según el método de la presente invención.

5 La figura 8 es una fotografía de la rodilla intacta mostrada en la figura 7, después del tratamiento según el método de la presente invención, que muestra la limpieza del implante, y la conservación de los tendones y ligamentos de la articulación.

10 La figura 9 es una fotografía de un aspecto anterior de una sección en corona a través del fémur próximo, antes del tratamiento según el método de la presente invención.

15 La figura 10 es una fotografía del aspecto posterior de la sección en corona a través del fémur próximo mostrado en la figura 9, después del tratamiento según el método de la presente invención.

20 La figura 11 es una fotografía de las secciones mostradas en las figuras 9 y 10, lado a lado, que demuestra la eficacia del tratamiento según la presente invención para eliminar sustancias endógenas.

25 La figura 12 es una fotomicrografía de una osteona procedente de hueso cortical, sin el tratamiento con el colorante fluorescente fluoroisotiocianato (FITC) (aumento de 400X).

30 La figura 13 es una fotomicrografía de una osteona procedente de hueso cortical, después de la inclusión de FITC en una de las disoluciones limpiadoras de la presente invención, que demuestra la profunda interpenetración del colorante en los intersticios óseos más pequeños - áreas verdes brillantes que indican estructuras que contienen FITC, incluyendo el gran conducto haversiano (margen derecho) y las lagunas satélite más pequeñas (área central; aumento de 400X).

35 La figura 14 proporciona un sistema modelo para ensayar la eficacia de un procedimiento de esterilización líquida para hueso cortical.

40 La figura 15 proporciona los resultados del tratamiento del hueso según el método de la presente invención, en comparación con el tratamiento irradiativo o de liofilización solo de un objetivo de ensayo de compresión ósea.

45 La figura 16 proporciona los resultados de la rehidratación de hueso cortical en condiciones de presión ambiental, presión negativa, presión positiva, o presión positiva y negativa cíclicas, según el método de la presente invención.

50 La figura 17 proporciona los resultados de un análisis de liberación de biomoléculas perfundidas a partir de una matriz ósea.

5.0 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

55 Como se usa aquí, el término “pasivar” pretende hacer referencia a la eliminación de organismos potencialmente patógenos y sustancias inmunógenas de un implante. De este modo, mediante este término se quiere decir esterilidad y antigenicidad reducida, aunque mediante este término no se quiere decir la eliminación de propiedades biológicas beneficiosas del implante, tales como propiedades osteogénicas (osteocoinducción u osteoinducción; fusión ósea), funcionalidad tisular natural, y resistencia estructural deseable de un implante. El término “pasivación” se prefiere al término “esterilizar” debido a que, aunque la esterilización es una meta, el término tiene una connotación absoluta que raramente se puede lograr de forma completa, si es que se logra, sin la destrucción del tejido acompañante. Además, aunque los implantes producidos según el método de la presente invención pueden no estar desprovistos completamente de cualquier antigenicidad o pirogenicidad, estos aspectos indeseables se reducen enormemente, y esto también es lo que se pretende decir con el término “pasivación”, como se usa aquí.

60 Los términos “perfundido” o “perfusión”, como se usan aquí, pretenden implicar la interpenetración eficaz de disoluciones limpiadoras o sustancias biológicamente activas en y a través de los canales y hendiduras de materiales destinados a su implantación en un receptor.

65 Como se usa aquí, los términos “rápido” o “rápidamente”, según se aplican al procedimiento de ciclo de presión según la presente invención, significan marcos de tiempo del orden de segundos a minutos, en lugar de horas o días.

70 Los términos “tratar con ultrasonidos” o “tratamiento con ultrasonidos”, como se usan aquí, significan la aplicación de energía sónica o ultrasónica vía un recipiente de un implante que sufre el tratamiento según el método de la presente invención en condiciones que permiten la transferencia eficaz de la energía sónica al implante. Los expertos en la materia están familiarizados con el procedimiento de tratamiento con ultrasonidos y las condiciones mediante las cuales se puede transferir energía sónica a través de un fluido hasta una pieza de trabajo, de forma que se logre la limpieza eficaz y una destrucción bacteriana o celular, sin dar como resultado un daño ultraestructural, importante, de la pieza de trabajo.

75 La presente invención proporciona un nuevo método para tratar materiales de implante, incluyendo, pero sin limitarse a, implantes metálicos, implantes sintéticos, implantes cerámicos, materiales de aloinjerto o de xenoinjerto, incluyendo hueso y tejido blando, tejidos mineralizados o desmineralizados, y combinaciones de los tipos anteriores

de tejidos. En particular, el tejido blando o los materiales óseos de aloinjerto tratados según el método de la presente invención permiten que se limpian a conciencia, se trabajen por medio de máquinas, se esterilicen, se empaqueten y después se implanten tejido blando o aloinjerto desprovisto de otras sustancias, o hueso de xenoinjerto, a economías de escala hasta ahora no posibles. En el pasado, los bancos de tejidos han intentado, tanto como ha sido posible, tratar 5 tejido procedente de donantes individuales, sin permitir el contacto entre tejido procedente de donantes diferentes. La preocupación ha sido que cualquier tejido de un donante dado puede contaminar tejido de otro donante. Debido al extremo valor de cualquier tejido de donante, el riesgo de que se encuentre un gran lote de tejidos de donante contaminado se ha considerado no razonable. Sin embargo, según el método de la presente invención, incluso si se incluye 10 en un lote de tejido reunido de donantes un tejido de donante muy contaminado, el material de injerto resultante, disponible para su implantación, es seguro para ello.

En la técnica se conocen métodos para minimizar el riesgo de que se cosechará y tratará un tejido de donante mediante un banco de tejido, denominado aquí como "cualificación del donante". En consecuencia, a través de un cribado de donantes, se aplican ensayos de tejidos mediante técnicas enzimáticas, inmunológicas, bioquímicas y de biología 15 molecular para minimizar el riesgo de que se incluirá tejido portador de patógenos (virus, bacterias, y similares) en los materiales tratados y puestos a disposición para la implantación. Ahora en la técnica es algo rutinario los ensayos para determinar la contaminación mediante el virus de inmunodeficiencia humana, VIH, el virus de la hepatitis B, HBV, el virus de la hepatitis C, HCV. Los métodos de cribado y de cualificación conocidos se incluyen deseablemente como una etapa inicial que precede al tratamiento del material de implante según el presente método. Debido al procedimiento 20 de limpieza, permeación y pasivación altamente eficaz del implante, englobado por la actual invención, es de esperar que se eliminarán, en cualquier caso, de los materiales de implante, en virtud del actual procedimiento de tratamiento del implante, organismos potencialmente patógenos aún no identificados, u organismos para los cuales aún se ha de desarrollar un ensayo rutinario (por ejemplo, priones). La redundancia en el nivel de limpieza del implante que se crea en el procedimiento de permeación y pasivación cíclico mediante presiones actual asegura la inactivación 25 de tales organismos o de factores potencialmente patógenos, mientras que al mismo tiempo permite un tratamiento eficaz del implante.

Para los fines de la siguiente descripción, hueso de aloinjerto se denomina como tejido ejemplar que se puede tratar según el presente método. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que se pueden tratar, según los 30 principios definidos aquí, otros tejidos, incluyendo pero sin limitarse a hueso de xenoinjerto, otros tejidos porosos, materiales porosos sintéticos, y diversos tejidos blandos. Dada la definición del término "implante" como se usa aquí, los expertos en la materia apreciarán que un implante según la presente invención puede comprender tejido de aloinjerto, tejido de xenoinjerto, o sus combinaciones. De este modo, debido a las mejoras del presente método, se puede combinar tejido de diferentes donantes, y de hecho se pueden combinar tejido animal y tejido de humano 35 tratados según el método de la presente invención, para formar un implante. En el caso de tejidos mineralizados, tales como hueso, el implante puede comprender tejido mineralizado, tejido parcialmente desmineralizado, tejido completamente desmineralizado, y sus combinaciones. Como es conocido en la técnica, hay una variación sustancial en las propiedades inductoras de hueso de diferentes preparaciones de matriz ósea desmineralizada (DBM) procedente 40 del mismo donante, e incluso diferencias mayores cuando la DBM, ya sea en forma de polvo o de otra forma, deriva de donantes diferentes. Los expertos en la materia apreciarán a partir de la presente descripción que la reunión de diversas preparaciones de DBM, para lograr lotes de DBM de calidad consistente y de capacidad inductora de hueso, está permitida por los métodos descritos aquí.

Según la presente invención, el material de hueso de aloinjerto procedente de donantes cualificados se trata en 45 primer lugar mediante diversos métodos reductores de biocarga conocidos, como la limpieza mediante la eliminación de tejido superfluo según los métodos conocidos en la técnica. Se puede emplear la disección manual para eliminar, de las superficies óseas, los ligamentos, tendones, piel, grasa, músculo, médula ósea suelta, y cualquier otro tejido no óseo. Como alternativa, se pueden emplear métodos automatizados o semiautomatizados conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los métodos descritos en las patentes US nº 5.333.626; nº 5.513.662; nº 5.725.579, y similares, 50 incorporadas aquí como referencia para este fin), para la limpieza inicial del material óseo del donante.

En esta etapa del procedimiento, los materiales de aloinjerto o xenoinjerto limpios procedentes de donantes individuales se pueden reunir y limpiar posteriormente como se describe más abajo. Como alternativa, el hueso de aloinjerto, autoinjerto o xenoinjerto se puede trabajar por medio de una máquina hasta las dimensiones finales del implante, 55 seguido de su reunificación con implantes dimensionados, tratados de forma similar, para la limpieza posterior como se describe más abajo. A partir de la descripción anterior y de la descripción que sigue, se puede apreciar que el tejido procedente de un único donante se puede tratar según el método de la presente invención. Sin embargo, el método actual también facilita la reunión de tejidos, iguales o diferentes, procedentes de más de un único donante. El método actual también proporciona la producción de implantes compuestos, en los que se combina un primer tejido procedente 60 de un primer donante con un segundo tejido procedente del mismo donante o de un donante diferente, para producir un implante compuesto unitario. Con el fin de hacerle un seguimiento, aunque los donantes individuales se habrían seguido hasta esta etapa, en la reunión se define un número de lote para su seguimiento posterior, manteniéndose los registros de todos los donantes que han contribuido al lote. En aún una alternativa adicional, y para asegurar la redundancia en el nivel de limpieza y de inactivación de contaminantes potencialmente patógenos, los materiales de 65 implante procedentes de donantes individuales se pueden tratar en primer lugar como se describe más abajo, antes de reunirlos con materiales de implante procedentes de donantes diferentes. En este caso, el material de implante procedente de donantes individuales se puede limpiar posteriormente de forma completa, o se puede trabajar por medio de una máquina en primer lugar hasta las dimensiones finales deseadas.

ES 2 281 980 T3

Cuando se aplica a hueso, tras la reducción de la biocarga inicial y la limpieza de la superficie, el método de la presente invención proporciona un tratamiento posterior mediante el cual se elimina eficazmente la médula ósea, sangre, proteínas, y materia en partículas, de tal forma que lo que queda es esencialmente una matriz de colágeno mineralizada, en la que se logra una reducción de 5 a 6 log en cualquier forma de organismos viables (virus, bacterias, amebas, rickettsia, hongos). Como se describe con mayor detalle más abajo, esto se logra mediante un procedimiento de ciclo u oscilación de presiones, empleando una variedad de disoluciones limpiadoras y de esterilización que se hacen interpenetrar eficazmente en la matriz. Mediante el ciclo repetido y el cambio de los disolventes limpiadores, se desatascan y se limpian los canales de esencialmente cualquier matriz porosa. Se emplea un ciclo de lavados predefinido y preprogramado, preferentemente con bombardeo ultrasónico concurrente, para lograr la esterilización penetrante del implante. Se ha encontrado que la combinación de presión de fluido oscilante y energía ultrasónica acelera la interpenetración de la disolución y la eliminación de sustancias endógenas. Cuando la meta es la interpenetración de ácidos nucleicos que codifican productos génicos deseados, se prefiere efectuar tal interpenetración en ausencia de energía ultrasónica. Esta consideración se aplica a cualquier compuesto biológicamente activo que puede ser sensible a la destrucción por energía ultrasónica.

A la vista de la descripción anterior, se apreciará que, en una forma de realización, la invención incluye un método que comprende las siguientes etapas:

1. evacuar rápidamente una cámara que contiene el implante, tal como materiales metálicos o sintéticos porosos, autoinjerto, aloinjerto o xenoinjerto;
2. llenar rápidamente la cámara con disoluciones limpiadoras - por ejemplo, mezclas de H_2O_2 /Triton X-100/TNBP/Betadine;
3. presurizar la cámara;
4. llevar a cabo rápidamente ciclos entre las etapas (1) y (3), entre aproximadamente 1-150 ciclos, manteniendo una temperatura entre aproximadamente 35-40 grados centígrados, con aplicación opcional de energía ultrasónica;
5. trabajar por medio de una máquina el producto según se deseé, si no se ha trabajado previamente por medio de una máquina;
6. repetir las etapas (1)-(4) usando las mismas composiciones limpiadoras, o diferentes, opcionalmente a temperatura elevada o reducida; y
7. realizar opcionalmente una etapa de descontaminación de la superficie, preferentemente en el envasado final, como en la exposición a H_2O_2 en fase de vapor o tratamientos de descontaminación de la superficie similares, conocidos en la técnica.

El procedimiento de pasivación por perfusión se define adicionalmente con referencia a la figura 1A. Esta representación esquemática muestra un implante (100) que comprende constituyentes estructurales sólidos (110), canales (120), y materiales adventicios (130) embebidos en los canales (120). Los constituyentes estructurales (110) pueden ser materiales sintéticos, como un material polimérico hecho por el hombre (por ejemplo, poli(ácido L-láctico), ácidos acrílicos, y similares), materiales estructurales metálicos, o materiales naturales, tal como una matriz de colágeno mineralizada o desmineralizada, hueso de autoinjerto, aloinjerto o xenoinjerto, u otro tejido. Los canales (120) pueden ser canales hechos por el hombre, definidos mediante el procedimiento de polimerización, moldeo, fusión u otro procedimiento de fabricación, o pueden ser canales naturales, tales como los encontrados en matrices de hueso esponjoso o cortical, mineralizadas o desmineralizadas. Los materiales adventicios (130) pueden ser desecho celular, médula ósea, células, lípidos, hidratos de carbono, proteínas, virus, bacterias, rickettsias, amebas, hongos y similares. En la figura 1A, los paneles (1) y (2) se refieren a la primera etapa descrita anteriormente. En el panel (1), los canales 120 se ceban para llenarlos con disoluciones limpiadoras exponiendo el tejido a presiones más bajas. En el panel (2), se muestra que los canales (120) aclarados están sustancialmente limpios de materiales adventicios (130). El panel (3) se refiere a las etapas 2 y 3, en las que las moléculas de la disolución limpiadora (140) se introducen en una cámara cerrada herméticamente, y se introducen en los canales (120) mediante presiones elevadas. El panel (4) se refiere a la cuarta etapa descrita anteriormente, en la que una disminución de presión elimina el desecho celular que queda, la disolución limpiadora (140), y otros materiales adventicios que quedan, de los canales (120), y nuevamente ceba a la matriz para la penetración profunda, ahora posible debido a la claridad de los canales (120). En los paneles (5)-(7), se muestra una repetición del ciclo según la cuarta etapa descrita anteriormente, con lo que, al volver a presurizar con disolventes limpios, se logra la completa interpenetración de los disolventes en la matriz del implante. En el panel (6), la presión reducida extrae la disolución que queda del implante, que entonces se puede secar, como se muestra en el panel (7), antes de un tratamiento posterior (por ejemplo, tratamiento por medio de una máquina según la etapa 5 anterior, después de la limpieza, según la etapa 6 anterior), y el envasado final del tejido limpio. El ciclo representado en la figura 1A se puede repetir tantas veces como se deseé, para asegurar la limpieza interna completa del interior de la matriz. En la figura 1B, se representa una representación de la oscilación de la presión y del fluido a lo largo de las diversas etapas del procedimiento descrito anteriormente.

ES 2 281 980 T3

Después de ser liberado médicaamente (es decir, pasar una batería de ensayos bioquímicos y de factor de riesgo, incluyendo, por ejemplo, PCR específica para VIH, y similares), el tejido del donante se limpia de cualquier tejido extraño o adventicio. El tejido así limpio se carga en una cámara de reacción que se puede cerrar herméticamente. Despues se inicia un proceso de limpieza de tejido, preferentemente preprogramado, que comprende una pluralidad de etapas de lavado. La interpenetración del tejido profundo por las disoluciones limpiadoras se logra oscilando la presión en la cámara, a la vez que se añaden y se eliminan diversos disolventes limpiadores. Se aplica energía ultrasónica a diversas etapas del proceso de limpieza para acelerar la penetración de la disolución y la eliminación de contaminantes indeseados o de sustancias endógenas, incluyendo sangre, lípido, y proteínas no estructurales o indeseadas. En un ciclo de limpieza preferido según la presente invención, las etapas (1-4) del procedimiento reivindicado se llevan a cabo según un protocolo similar al definido en la siguiente tabla para eliminar sangre, grasa, contaminación bacteriana, vírica, fúngica u otra contaminación:

TABLA I

15

20

25

30

35

40

45

50

Etapa	Presión	Fluidos	Tratamiento con ultrasonidos	Duración (min.)	Fin
0	Atmosférica	Ninguno	Apagado	NA	Cargar el tejido en la cámara
1	Negativa (60-100 torr)	Ninguno	Apagado	2	Cebar la matriz de tejido, eliminar el aire incluido y el desecho suelto
2	Negativa (60-100 torr)	B, C, D, E, mezclas	Encendido	1	Desgasificar los fluidos limpiadores
3	Positiva (5-8 atmósferas)	B, C, D, E, mezclas	Encendido	1	Forzar a los fluidos hacia el interior de la matriz de tejido
4	Negativa/Positiva	B, C, D, E, mezclas	Encendido	(1 x n)	Eliminar el desecho liberado por los fluidos, oscilar la presión y tratar con ultrasonidos

Fluidos:

B = Triton X-100/TNBP, un disolvente/detergente para eliminar desecho y matar virus y bacterias;

C = peróxido de hidrógeno al 3%, para eliminar desecho celular, virus y bacterias inactivos;

D = mezcla de B y C;

E = alcohol miscible en agua, tal como etanol o isopropanol;

mezclas = B, C, D, E en cualquier proporción deseable.

Según la Tabla I, en la etapa 0, a presión atmosférica, y sin fluido ni tratamiento con ultrasonidos, se carga una cámara presurizable, en la que se puede llevar a cabo el procedimiento, con materiales de implante metálicos, sintéticos o con otros materiales de implante hechos por el hombre, tejido blando o hueso de autoinjerto o aloinjerto, tejido blando o hueso de xenoinjerto, procedentes de un donante cualificado individual. Se entenderá además que el implante tratado puede comprender una combinación de tejido y materiales sintéticos, tal como, por ejemplo, biopolisulfona y similar. Cuando el implante es un tejido, el tejido se limpia en primer lugar de tejido adventicio de la superficie, antes de iniciar las etapas mostradas en la tabla I. En la etapa 1, a presión negativa (vacío), durante un período de aproximadamente dos minutos, se ceba la matriz del implante o implantes (es decir, véase la figura 1, etapa 1, para eliminar aire atrapado, desecho celular u otro desecho libre, mediante vacío). En la etapa 2, a presión negativa, se introduce fluido limpiador con ultrasonidos, para ayudar a la penetración del fluido, y para asegurarse de que se elimina el gas del fluido introducido. En la etapa 3, a presión positiva, y en presencia de un disolvente limpiador apropiado y ultrasonidos, se fuerza al disolvente a introducirse en la matriz del implante. Despues, sigue una serie de "n" ciclos de presión positiva y negativa en presencia de disolvente y de ultrasonidos, durante los cuales los canales de la matriz se llenan y se vacían de disolución y de desecho. El número de veces que se repite esta etapa puede ser desde 1 hasta aproximadamente 150 veces (es decir n = 1-150; preferentemente, n es aproximadamente 10-50 veces).

ES 2 281 980 T3

Después de la etapa 4 en la Tabla I, el fluido limpiador se elimina como desecho a presión positiva, el tejido se seca a presión negativa, y se aclara varias veces con presión positiva y negativa oscilantes, o con aumento y disminución de presión, usando agua estéril o disolución salina fisiológica (por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato, PBS), con o sin ultrasonidos concomitante. El número de ciclos de aclarado puede ser de 1-150 veces, y es preferentemente aproximadamente 1-50 veces. La disolución de aclarado se drena a presión positiva, y el tejido se seca nuevamente a presión negativa.

Después de la eliminación del grueso de la contaminación según las etapas perfiladas anteriormente, el tejido del procedimiento se puede trabajar por medio de máquinas para darle forma de injertos dimensionalmente acabados, si tal tratamiento no se ha logrado previamente, (etapa 5 del procedimiento actual, como se define anteriormente), y después se carga en una cámara de reacción, igual o diferente de la usada para llevar a cabo las etapas según la Tabla I. Después se realiza un ciclo de limpieza, pasivación o esterilización con penetración profunda, preferentemente con un control lógico programable, según un protocolo similar al definido en la Tabla II (véase la etapa 6 definida anteriormente, que representa una repetición de las etapas 1-4 de la Tabla I, opcionalmente usando diferentes disolventes limpiadores; estas etapas se distinguen indicando las etapas como 0'-4'):

TABLA II

Etapa	Presión	Fluidos*	Tratamiento con ultrasonidos	Duración (min.)	Fin
0'	Atmosférica	Ninguno	Apagado	NA	Cargar el tejido en la cámara
1'	Negativa (60-100 torr)	Ninguno	Apagado	2	Cebar la matriz de tejido, eliminar el aire incluido y el desecho suelto
2'	Negativa (60-100 torr)	F, G, H, I, J, mezclas	Encendido	1	Desgasificar los fluidos limpiadores
3'	Positiva (8-10 atmósferas)	F, G, H, I, J, mezclas	Encendido	1	Forzar a los fluidos hacia el interior de la matriz de tejido
4'	Negativa/Positiva	F, G, H, I, J, mezclas	Encendido	(1 x n)	Eliminar el desecho liberado por los fluidos, oscilar la presión y tratar con ultrasonidos

*Fluidos:

F = urea 6 M u otros agentes caotrópicos, por ejemplo guanidina HCl 4 M, para reducir la antigenicidad del implante;

G = hipoclorito sódico al 1%, para inactivar virus, bacterias, hongos u otros contaminantes residuales;

H = hidróxido sódico 1 N, para inactivar virus y bacterias;

I = peróxido de hidrógeno al 6%, como esterilizante

J = hexano, éter, dietanolamina (DEA), tolueno, xileno, butano, CO₂ (supercrítico), isobutano, propano, acetona, isopropanol, metanol, cetonas, éteres, hidrocarburos alifáticos o aromáticos, HCl, HCl gaseoso;

mezclas = F, G, H, I, J, en cualquier proporción deseable.

Después de la etapa 4' en la Tabla II, el fluido limpiador se retiene preferentemente en una cámara de reacción presurizada positivamente, durante un período prolongado, para asegurar el extermínio completo de cualquier patógeno contaminante residual, o cualquier otro organismo. Para este fin, es suficiente un período de uno a sesenta minutos, y preferentemente aproximadamente diez minutos. Después, el fluido limpiador se elimina en forma de desecho a presión positiva, el tejido se seca a presión negativa, y se aclara varias veces con una presión positiva y negativa oscilante, usando agua estéril o disolución salina fisiológica (por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato, PBS, o similar), con o sin ultrasonidos concomitante. La disolución de aclarado se drena a presión positiva, y el implante se seca nuevamente a presión negativa.

Los expertos en la materia apreciarán que se pueden modificar los detalles específicos del procedimiento esquematizado según las Tablas I y II anteriores. Esencialmente, se pueden usar otros disolventes limpiadores u otras concentraciones que los sugeridos aquí, el número de oscilaciones entre la presión elevada y la reducida, y los tiempos de los ciclos, los niveles de presurización y de despresurización, y los períodos, se pueden alterar, según los requisitos para un tejido dado. Sin embargo, las condiciones especificadas en las Tablas I y II dan como resultado una limpieza que penetra profundamente, como se evidencia por la capacidad para introducir profundamente los colorantes dentro de las matrices de los tejidos, para eliminar colorantes que se han dejado empapar profundamente en las matrices de tejidos, y la capacidad para eliminar o exterminar contaminantes endógenos o biológicos añadidos, incluyendo una amplia variedad de bacterias, virus y hongos. Los tejidos limpiados según este procedimiento incluyen, pero no se limitan a:

5 hueso cortical, hueso esponjoso, fascia, articulaciones completas, tendones, ligamentos, duramadre, pericardios, válvulas cardíacas, venas, tejido neuronal, tejido submucosal (por ejemplo, tejido intestinal), y cartílago. El hueso tratado según este método, y analizado subsiguentemente para determinar la resistencia biomecánica retenida y la capacidad para inducir nueva formación ósea (osteocoinducción y osteoinducción, colectivamente denominado como actividad osteogénica), retiene una buena resistencia biomecánica, y es de esperar que retenga la actividad osteogénica. Además,

10 15 se encontró que el hueso tratado según una forma de realización de este método, e implantado como un xenoinjerto, induce poca o ninguna reactividad inmunológica adversa, indicando una reducción de la antigenicidad del material. Esto es particularmente cierto cuando se usa urea u otros agentes caotrópicos (por ejemplo, hidrocloruro de guanidina) como uno de los fluidos limpiadores, o se incluye en una mezcla de fluidos limpiadores.

20 El método descrito aquí sugerirá a los expertos en la materia un número de posibles métodos alternativos para facilitar la reunión de tejido como se describe aquí, y los dispositivos para lograr las etapas programadas definidas más arriba. De este modo, por ejemplo, en una forma de realización según la presente invención, se puede emplear un dispositivo tal como el mostrado esquemáticamente en la figura 2 para la implementación semimanual del procedimiento de pasivación cíclica por perfusión de la presente invención.

25 Según esta forma de realización de la invención, se adapta una cámara (200) que comprende una tapa (210) y una cubeta (220), para la pasivación por perfusión cíclica de implantes. Se proporciona una serie de postes (230), sobre los que se puede sujetar una serie de pernos (240) para asegurar la tapa (210) a la cubeta (220). En el interior de la cámara (200) se proporciona una rejilla (250) para recibir el material de implante a tratar. A través de la tapa (210) se proporciona una serie de puertos de acceso (260, 261, 262, 263). El puerto de acceso (260) es una tubería de entrada de agua estéril. El puerto de acceso (261) es una tubería de entrada para otros líquidos. El puerto de acceso (262) es una tubería de vacío. El puerto de acceso (263) es una tubería para la entrada de presión. Además, se proporciona un puerto (264) para la inserción de una sonda de temperatura. El puerto (265) es un puerto para suministrar energía a un aparato de ultrasonidos dispuesto en las paredes (225) de la cámara (200). El puerto (266) es un drenaje. En consecuencia, un dispositivo tal como el mostrado en la figura 2 se podría usar para llevar a cabo el procedimiento de pasivación por perfusión cíclica según la presente invención.

Con referencia a la figura 3, se puede definir un aparato 300 automatizado o semiautomatizado, para llevar a cabo el actual procedimiento. Por esta descripción, los controladores lógicos programables activan o desactivan válvulas o solenoides (301a-h) a tiempos predeterminados en el ciclo de limpieza. Se coloca un implante en una cámara de reacción (310), que se cierra herméticamente. Se proporciona una purga (320) atmosférica para permitir la entrada y eliminación de aire filtrado, y se proporciona un drenaje (321) para eliminar el desecho o los disolventes. Los fluidos limpiadores se introducen en la cámara de reacción (310) a partir de un tanque (330) de mezclamiento químico, que tiene una purga filtrada a la atmósfera (335), para evitar la formación de vacío en el tanque (330). Las tuberías (340) de alimentación química van desde los depósitos (341) de fluidos hasta el tanque (330) de mezclamiento químico, vía un conducto (345) normal. Una bomba (350) controlada de forma programable se hace funcionar para bombear los fluidos apropiadamente mezclados desde el tanque (330) hasta la vasija (310) de reacción. Se aplica vacío o presión negativa a la vasija de reacción (310) por medio de un tanque (360) receptor de vacío, en el que se crea una fuente de presión negativa mediante una bomba (365) de vacío. La inclusión de un depósito (360) de vacío es deseable de forma que se pueda aplicar a la cámara de reacción (310) un vacío esencialmente instantáneo de dimensiones conocidas, sin la necesidad de una bomba de vacío, tal como (365), que tiene que desarrollar gradualmente la presión negativa. El tanque (360) receptor de vacío se puede evacuar mediante la bomba (365) mientras que el tanque de reacción (310) está a presión positiva. En el tanque de almacenamiento (370) se proporciona una fuente de agua estéril, disolución salina fisiológica, o disolución acuosa similar, el cual tiene una purga filtrada (375) para evitar la formación de vacío en el tanque (370). La bomba (376) proporciona una infusión rápida de la disolución acuosa en el tanque (330) de mezclamiento químico, para la introducción en la cámara de reacción (310). Los expertos en la materia apreciarán que el agua procedente del tanque (370) también se puede introducir directamente en el tanque de reacción (310), sin tener que ser introducida primeramente en el tanque (330) de mezclamiento químico. La presión positiva se almacena en el tanque de presión (380) que se presuriza mediante un compresor de gas filtrado, para retener la esterilidad en el tanque de reacción (310). En la práctica, un ordenador programado apropiadamente, o controladores lógicos programables, permiten purgar la cámara de reacción (310), para permitir la carga del tejido. La cámara se cierra entonces herméticamente, se evacua, se presuriza, y se introduce y elimina fluido, como se esquematiza, por ejemplo, en las Tabla I y Tabla II anteriores, para completar el procedimiento de limpieza del implante. Además, se proporciona una fuente de corriente estéril filtrada (322) para esterilizar rápidamente la zona interna, filtrada y estéril del dispositivo. También es deseable incluir un medio (323) intercambiador de calor, para equilibrar rápidamente la temperatura del sistema. Los medios enfriados con agua, enfriados con aire, enfriados con nitrógeno, calentados con agua, calentados con termopares, o medios radiativos similares, son todos ellos aceptables, dependiendo de las temperaturas internas deseadas.

La perfusión manual o automatizada de fluidos limpiadores y esterilizantes, como se esquematiza anteriormente, da como resultado la reducción de la biocarga del material de implante procedente de donantes individuales, antes de reunirlo con materiales de implante procedentes de otros donantes para el tratamiento del lote. La reducción de la biocarga inicial se puede lograr según un protocolo tal como se esquematiza en la Tabla I, para reducir la contaminación 5 potencial de un implante no contaminado al entrar en contacto con un implante contaminado. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que el procedimiento de pasivación penetrante de la presente invención es tan eficaz que, para ciertos tipos de implantes en los que la posibilidad inicial de encontrar un implante contaminado es suficientemente 10 baja, puede ser posible tratar simplemente por lotes los materiales de implante según Tabla I y Tabla II, en lugar de limpiar primeramente los implantes de un donante individual según el programa de la Tabla I, antes de combinar tales materiales de implante procedentes de donantes diferentes, y tratar los implantes reunidos según el programa de la Tabla II.

Cuando se considera prudente una etapa inicial de reducción de la biocarga para materiales de implante derivados 15 de donantes individuales, los tejidos de donantes individuales se tratan según el programa de la Tabla I, y después se someten a cuarentena hasta que se pasen todos los criterios de control de calidad. Sólo los tejidos de donantes individuales que pasan tal control de calidad después de la reducción de la biocarga inicial se reúnen para el tratamiento 20 según el protocolo de la Tabla II. Como programa de reducción de la biocarga inicial, se puede usar una combinación de Triton X-100 y TNBP como un primer disolvente para eliminar desechos, y para inactivar bacterias y virus. Un segundo disolvente puede ser una disolución de peróxido de hidrógeno al 3%, para eliminar el desecho celular y para reducir adicionalmente la biocarga. Un tercer disolvente puede ser disolución de povidona yodada, para reducir 25 todavía más la biocarga. Finalmente, se puede emplear una disolución de ácido ascórbico para decolorar el implante o eliminar cualquier yodo residual. Estas disoluciones se pueden emplear en diferente orden, y de hecho se pueden usar disoluciones diferentes para un efecto similar. Sin embargo, se prefieren las disoluciones particulares enumeradas, debido a su baja toxicidad, y al descubrimiento de que la combinación definida de disoluciones da como resultado una reducción eficaz de la biocarga, proporciona limpieza, pasivación e interpenetración. Las disoluciones de la Tabla I se emplean típicamente en un ciclo tal como el mostrado en la Tabla I, etapas 0-4.

En esta etapa del procedimiento, el tejido de aloinjerto o de xenoinjerto limpio, procedente de donantes individuales o de donantes previamente reunidos, se reúne opcionalmente y se limpia además como se describe a continuación. 30 Como alternativa, se da en primer lugar una dimensión al tejido trabajándolo por medio de una máquina, cortándolo y similar, para lograr las dimensiones finales del implante. El tejido dimensionado se trata adicionalmente de forma individual, o se reúne con un lote de implantes dimensionados, tratados de forma similar o diferente, para la limpieza adicional como se describe más abajo. Además, se apreciará a partir de esta descripción que se pueden combinar diferentes tejidos procedentes del mismo donante o de donantes diferentes, antes, durante o después del 35 tratamiento según el método de la presente invención, a fin de producir un producto compuesto individual. De este modo, por ejemplo, se puede combinar gelatina de colágeno o un material similar, tal como el descrito en el documento WO 98/40113 (incorporado aquí como referencia) con materiales cerámicos bioactivos, tal como vidrio bioactivo y similar, hidroxilapatita o similar, virutas de hueso o similar, y después se puede empaquetar en un implante procedente de otro donante o del mismo donante, tal como el dispositivo de la patente US nº 5.814.084 (incorporada aquí como 40 referencia). Se apreciará además que el dispositivo tal como se describe según la patente 5.814.084 se puede producir a partir de un donante individual o un conjunto de tejidos de donantes tal como se trató según la presente invención. El material compuesto final derivaría así de tejidos de donantes potencialmente múltiples, cada uno de los cuales 45 pueden haber derivado de múltiples donantes, y tratados según el método de la presente invención. Con el fin de hacer un seguimiento, aunque los donantes individuales habrán sido seguidos en esta etapa, al reunificarlos, se define un número de lote para su seguimiento posterior, manteniéndose los registros de todos los donantes que han contribuido a un lote dado.

En la Tabla II se describe un conjunto de disoluciones para lograr la esterilización penetrante de los tejidos individuales o de tejidos reunidos de diferentes donantes que ya han sido tratados según el programa esquematizado en 50 la Tabla I. De este modo, se puede usar para lograr la esterilización una primera disolución de peróxido de hidrógeno al 6%, seguido de una segunda disolución de hipoclorito sódico al 1%, seguido de una disolución de hidróxido de sodio 1 N. Como germicida de amplio espectro, se puede usar una disolución al 70% de isopropanol. De este modo, las disoluciones de la Tabla I y de la Tabla II se pueden emplear según el programa mostrado, o se pueden modificar 55 según sea necesario. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden emplear diferentes agentes esterilizantes penetrantes, o que pueden ser posibles mezclas de los esterilizantes descritos. En cualquier caso, al finalizar esta etapa del procedimiento, el lote individual o reunido de implantes se ha limpiado a conciencia, se ha pasivado (si no se ha esterilizado), y está interpenetrado por las disoluciones limpiadoras. Según el procedimiento descrito aquí, se logran reducciones de la contaminación por virus con cubierta, bacterias vegetativas y hongos de hasta doce logs o más, y de 60 virus sin cubierta y esporas de hasta aproximadamente cinco logs. Además, se logra una reducción de los niveles de endotoxina de aproximadamente dos hasta diez veces, junto con una eliminación significativa de sangre, lípido, ácido nucleico, y proteína no estructural. Además, este procedimiento retiene las propiedades estructurales beneficiosas y otras propiedades biológicas deseables del material de implante. También se logran mejoras significativas en los rendimientos de producción, a través de la capacidad para tratar por lotes los implantes procedentes de donantes reunidos.

65 Despues de la pasivación penetrante de los materiales del implante, estos se colocan en su envase final. Preferentemente, esto se logra en un entorno estéril, para evitar la introducción de cualquier biocarga adventicia. Para asegurar un envasado estéril, con los injertos finales trabajados por medio de una máquina en sus envases finales, no cerrados herméticamente, los implantes se exponen a un entorno esterilizante de peróxido de hidrógeno/ácido peracético en fase

de vapor, o un entorno esterilizante en fase de vapor similar. Los envases se cierran entonces para asegurar que no se produzca contaminación al retirar los implantes del campo estéril, para el almacenamiento o su envío a los cirujanos. Los envases cerrados herméticamente se pueden someter entonces, opcionalmente, a niveles de radiación gamma o de otros tipos de radiación que se sabe que no afectan adversamente a las propiedades de los tejidos (por ejemplo, 5 por debajo de aproximadamente 3,0 Mrad, o durante períodos cortos de tiempo para efectuar la esterilización de la superficie, y para asegurar la destrucción interna de cualesquier organismos de gran genoma residuales; sin embargo, tal tratamiento interno no se requiere generalmente, habiéndose logrado la esterilización profunda según el protocolo de limpieza, o una variante del mismo, como se describe aquí en este documento). En esta etapa también se pueden realizar otros métodos de esterilización de la superficie y de esterilización interna redundante, incluyendo la exposición 10 a haces de electrones, la exposición a óxido de etileno, y similar, en tanto que no se produzca de ese modo una toxicidad ni se produzca una disminución de las actividades biológicas deseables.

Como una mejora adicional del procedimiento definido aquí está la capacidad para producir materiales de implante con perfusión de bioactividades deseables. En consecuencia, en las etapas de aclarado final, después de las etapas 0-15 4 de la Tabla I, o las etapas 0'-4' de la Tabla II, se puede emplear una disolución que contiene antibióticos, fármacos antiinflamatorios u otros agentes biológicamente activos deseados, para infundir sustancias antibióticas u otras sustancias bioactivas deseadas en los tejidos limpios, pasivados. Como alternativa, o además, se pueden perfundir en el implante factores de crecimiento, tales como proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento derivados de cartílago, factores de crecimiento de tejidos, naturales (autoinjerto, aloinjerto o xenoinjerto), o recombinantes, y similares, 20 conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, en ausencia de ultrasonidos durante la etapa de perfusión, se infunde en el implante una disolución que contiene ácidos nucleicos expresables en forma de vector de ADN o ARN plasmídico, vírico o lineal. El ácido nucleico codifica preferentemente un factor de crecimiento apropiado, un agente antineoplásico, un péptido o una proteína, dependiendo de la naturaleza del tejido en el que se perfunde el ácido nucleico. Por ejemplo, cuando se infunde en la matriz ósea un ácido nucleico bajo el control de un promotor 25 de CMV o similar, preferentemente se codifican uno o más genes que codifican proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Como alternativa, cuando se infunde un tejido cartilaginoso, el ácido nucleico puede codificar una proteína morfogénica derivada de cartílago. Como alternativa, o además, el ácido nucleico puede codificar factores de crecimiento de tejidos (beta y similar), péptidos (por ejemplo, P/5 y similar), o cualquier otro producto génico deseable. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN, o puede ser sus combinaciones, opcionalmente incluyendo nucleótidos sintéticos 30 o marcadores para hacer un seguimiento de la penetración y concentración del ácido nucleico. Además, moliendo finamente la matriz ósea desmineralizada (DBM), y formando una suspensión hidratada o una mezcla acuosa de la misma, los implantes se pueden perfundir con la DBM que contiene una mezcla compleja de factores de crecimiento. Como alternativa, usando el método de la presente invención, se puede desmineralizar parcialmente un implante óseo 35 para exponer los factores de crecimiento antes de la implantación. De forma similar, se pueden perfundir igualmente médula ósea o extractos de médula ósea en la matriz de un implante apropiado.

En una forma de realización adicional de la presente invención, el procedimiento de limpieza se aplica para librarse a un tejido de un organismo o afección patógena. Esto se puede lograr, por ejemplo, cosechando una mandíbula enferma o cualquier otro hueso o tejido, destrozado por el crecimiento de células cancerosas. La sección de autoinjerto se limpia 40 y se pasiva *ex vivo*, se perfunde con factores de crecimiento, ácidos nucleicos que codifican factores de crecimiento, antibióticos, antineoplásicos, analgésicos antiinflamatorios o cualquier otra sustancia biológicamente activa deseada, y después se reimplanta en el mismo paciente o en un paciente diferente, para proporcionar un tejido no patógeno.

Como se puede apreciar a partir de la descripción detallada anterior, el procedimiento de la presente invención 45 se puede llevar a cabo en cualquier etapa de la producción del implante, y no requiere preparaciones especiales tales como eliminación del cartílago, o etapas que dañen potencialmente el implante, tal como la perforación de orificios. Además, se apreciará a partir de esta descripción que el método de la presente invención describe ampliamente un procedimiento para la producción de un inventario de tejido en la que, en una primera fase, se reúne tejido procedente de una pluralidad de donantes, y se procesa según el método de la presente invención. El resultado es una reserva de 50 materiales utilizables de unidades fundamentales, disponible para un tratamiento posterior según sea necesario. En una segunda fase, a medida que aumenta la necesidad, las unidades de tejido fundamentales disponibles en el inventario se procesan adicionalmente, si es necesario, a fin de producir el producto final requerido para la implantación. De esta manera, la presente invención proporciona un avance significativo y fundamental en la técnica mediante lo cual se logran tremendas mejoras en la eficacia, puesto que se implementa un único episodio de tratamiento para generar un gran volumen de tejido disponible para la implantación o su tratamiento posterior. En comparación con la situación existente en el tratamiento de tejido de donante, por la cual se puede requerir para cada donante y para cada tejido un episodio de tratamiento separado para derivar un único producto, tras lo cual es necesario cambiar todo el equipo y personal de tratamiento para recibir un nuevo tejido de un nuevo donante. En consecuencia, el método de la presente invención permite por sí mismo un control de calidad muy mejorado, un control del inventario y una eficacia. 60

Como una ventaja añadida e inesperada de la presente invención, en una forma de realización, el procedimiento elimina eficazmente, diluye o desnaturaliza enzimas endógenas que de otro modo pueden dar como resultado la degradación o autolisis de la matriz ósea o de la matriz del tejido. Esto se logra, por ejemplo, exponiendo cíclicamente el tejido a detergentes, agentes reductores (por ejemplo, ditiotreitol, DTT, y similares, conocidos en la técnica por destruir enlaces de disulfuro de proteínas), peróxido, isopropanol y similar, como se describe aquí. Como resultado de la eliminación, dilución o destrucción de la actividad enzimática endógena, se reduce o se elimina la necesidad de congelar o de liofilizar el implante, proporcionando una ventaja significativa. Es un problema constante en la técnica mantener tejidos de implante en estado congelado, y es lento y caro liofilizar (secar por congelación) tejidos 65

de implantes, incluyendo implantes de huesos de aloinjerto, autoinjerto o xenoinjerto. Tratando tales tejidos según la presente invención, y almacenando después los tejidos en un entorno estéril o en un envase estéril, se elimina el coste y los retrasos de tiempo inherentes en la congelación y liofilización de tejidos.

5 Como una ventaja adicional de la presente invención, los expertos en la materia apreciarán que se pueden eliminar sustancialmente, reuniendo tejidos según la presente metodología, las variaciones de lote a lote que se pueden producir cuando se producen diversos tejidos, ya sea del mismo donante, y en particular de donantes diferentes. De este modo, en un ejemplo específico, la matriz ósea desmineralizada (DBM), producida a través de una forma de realización de la 10 presente invención, o producida mediante un método separado, se puede tratar según la presente invención, y los lotes de DBM procedentes de donantes diferentes se pueden reunir entonces de forma segura para producir lotes reunidos de DBM que muestran propiedades inductoras de hueso consistentes para aplicaciones ortopédicas, ortodóncicas o periodontales. Además, los expertos en la materia apreciarán que un beneficio adicional de la presente invención es 15 que se pueden aumentar las cantidades hasta ahora limitadas de tejido humano tratando apropiadamente tejido de xenoinjerto (animal) para reducir su antigenicidad, y después usando el xenoinjerto así tratado solo o en combinación con aloinjerto, autoinjerto o con ambos.

Se apreciará además a partir de la presente invención que se pueden lograr modificaciones deseables en las propiedades de los tejidos a través de la implementación de diversas realizaciones de la presente invención. De este modo, por ejemplo, la actual invención incluye el descubrimiento de que, a través de la implementación de la actual metodología, 20 se puede desmineralizar parcialmente o se puede desmineralizar completamente la matriz ósea, de manera controlada. Además, se ha encontrado que la presente invención es valiosa en la desmineralización parcial de tejido óseo usando, por ejemplo, ácido acético o ácidos orgánicos similares, ácido clorhídrico, o ácidos inorgánicos similares, o agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y similares. Como resultado, esta metodología se 25 puede usar para alterar eficaz las propiedades de fractura en el esfuerzo del hueso así tratado, que entonces se puede almacenar congelado, liofilizado o a temperatura ambiente, como se describe aquí anteriormente.

Como un medio para proporcionar un concepto global del movimiento del método según la presente invención, se describe la representación esquemática provista según la figura 4. En la etapa 1, se introducen materiales del donante en la instalación de tratamiento del tejido de donante, y se conservan en cuarentena hasta que el donante del que deriva el tejido haya sido afectado. En la etapa 2, los materiales liberados del donante se limpian en su superficie eliminando el material secundario. En la etapa 3, el tejido con la superficie limpia se trabaja por medio de una máquina para producir implantes de las dimensiones finales deseadas, y se introducen en una cámara de pasivación por perfusión cíclica automatizada según la presente invención. En la etapa 4, los implantes que se han pasivado se introducen en sus recipientes de envase final, y se esterilizan terminalmente mediante radiación gamma, exposición en fase de vapor 35 a descontaminantes, y similar. Finalmente, en la etapa 5, los injertos pasivados y envasados se almacenan y se liberan después de la verificación de los ciclos de esterilización.

En una forma de realización adicional de la presente invención, se puede emplear una disposición del procedimiento similar a la mostrada esquemáticamente en la figura 5. Según esta disposición, una instalación (500) de tratamiento 40 muestra tres instalaciones (A-C) de tratamiento de tejido paralelas e idénticas. Comenzando en las cámaras (510A-C) de eliminación del material secundario, el tejido a tratar según la presente invención se limpia y se despeja de tejidos gruesos, adventicios e indeseados. El tejido limpio se introduce entonces, vía un puerto (515A-C) cerrable herméticamente, en una cámara de reacción (310A-C), a la que están conectados todos los dispositivos de control y de entrada/salida del proceso, mostrados en la figura 3. Al terminar un ciclo de limpieza tal como el definido según la 45 Tabla I, el tejido se retira vía el puerto (516A-C) cerrable herméticamente. El tejido limpio se clasifica y se almacena en congeladores (520A-C) de cuarentena, hasta que el control de calidad demuestra que el tejido es adecuado para un tratamiento posterior. Los tejidos liberados se transfieren entonces a habitaciones (530A-C) de producción de injertos, en las que se realiza el dimensionamiento y el tratamiento por medio de una máquina del implante final. Tras la 50 producción de los implantes finalmente dimensionados, los tejidos así procesados se cargan en las cámaras de reacción (310'A-C) vía el puerto (535) cerrable herméticamente. No mostrados pero conectados a la cámara de reacción (310'A-C) se encuentran todos los dispositivos de control y de entrada/salida del proceso mostrados en la figura 3. Tras una limpieza adicional, tal como la definida según la Tabla II, los tejidos esterilizados en profundidad se retiran 55 desde el puerto (536A-C) cerrable herméticamente, y se colocan en el envase final. La esterilización terminal se realiza en las estaciones (540A-C), y los tejidos esterilizados terminalmente se cierran herméticamente en el envase final. Los envases cerrados herméticamente de tejidos esterilizados terminalmente se ponen en cuarentena en congeladores (545) hasta que el ensayo de control de calidad final permite el envío del tejido a los cirujanos.

Se apreciará que, aunque se prefiere la disposición del procedimiento proporcionada en la figura 5, ésta sólo se sugiere, y el procedimiento según la invención se puede realizar en otros formatos de disposición. Además, se apreciará 60 que, según la disposición mostrada de acuerdo con la figura 5, es deseable que se reduzca el nivel de partículas ambientales, ya que el tejido se procesa a través de las diversas etapas mostradas. De este modo, aunque es adecuado que la cámara (510) sea de clase 100.000 (100.000 partículas por billón), es deseable que las áreas (520) y (530) sean de clase 10.000 o menor. El área (540) de envasado final es preferentemente un área de clase de aproximadamente 1000.

65 Habiendo descrito generalmente y con detalle la presente invención, incluyendo su mejor modo, se proporcionan los siguientes ejemplos específicos para exemplificar adicionalmente, pero no limitar, la invención descrita, cuyo alcance se debe de revisar con referencia a las reivindicaciones anexas a la misma, y sus equivalentes.

6.0 Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Protocolo de limpieza específico para hueso*

En una forma de realización preferida de la presente invención, se limpia un implante óseo intacto o trabajado por medio de una máquina mediante un tratamiento secuencial con povidona-I, agua, ácido ascórbico, TNBP/peróxido de hidrógeno, agua, dietanolamina, agua, urea 6 M, agua. La secuencia de ultrasonidos y de fluctuaciones de presión 10 se realiza según la secuencia definida en la Tabla I o en la Tabla II. Sin embargo, se apreciará de esta descripción que se puede emplear una amplia variedad de diferentes soluciones limpiadoras y sus combinaciones, según el método de la presente invención. Por ejemplo, las soluciones limpiadoras pueden incluir: agua estéril, Triton X-100, TNBP, peróxido de hidrógeno al 3%, un alcohol miscible en agua, una solución salina, povidona yodada, 15 disolución de ácido ascórbico, hidrocarburos aromáticos o alifáticos, éteres, cetonas, aminas, urea, hidrocloruro de guanidina, ésteres, glucoproteínas, proteínas, sacáridos, enzimas tales como proteasas (tripsina, pepsina, subtilisina), lipasas, sacarinas, y similares, ácidos gaseosos o peróxidos, y sus mezclas. El procedimiento se realiza a temperatura ambiente, a temperatura elevada (ochenta grados centígrados), o a temperaturas reducidas. De este modo, se contempla mediante la presente invención la limpieza de implantes en una fase de nitrógeno líquido (ochenta grados centígrados 20 negativos).

20 Ejemplo 2

Eficacia del procedimiento para la limpieza del implante

25 La figura 6 es una fotografía de un húmero completo después de ser tratado según el método de la presente invención; una sección en corona a través de la cabeza del húmero revela la limpieza de la matriz ósea interna.

Ejemplo 3

30 *Eficacia del procedimiento para limpiar implantes de tejido duro y de tejido blando*

La figura 7 es una fotografía de una rodilla intacta, incluyendo la tibia próxima, el fémur distante y la rótula, junto con tendones y ligamentos articulantes, antes del tratamiento según el método de la presente invención.

35 La figura 8 es una fotografía de la rodilla intacta mostrada en la figura 7, después del tratamiento según el método de la presente invención, que muestra la limpieza del implante, y la conservación de los tendones y ligamentos articulantes.

40 A la luz de estos resultados, se pondrá de manifiesto que los materiales del implante y los tejidos que se pueden limpiar eficazmente según este procedimiento incluyen, pero no se limitan a, implantes metálicos, implantes sintéticos, implantes cerámicos, tejidos de aloinjerto, de autoinjerto o de xenoinjerto. Tales tejidos se pueden seleccionar de tejidos que comprenden: hueso cortical, hueso esponjoso, fascia, articulaciones completas, tendones, ligamentos, duramadre, pericardia, válvulas cardíacas, venas, tejido neuronal, tejido submucosal (por ejemplo, tejido intestinal), y cartílago. Esencialmente, cualquier material implantable que tenga una matriz interna que se requiera limpiar se puede 45 tratar ventajosamente según el método de la presente invención.

Ejemplo 4

Eficacia del procedimiento de la presente invención para la limpieza profunda de implantes

50 La figura 9 es una fotografía de un aspecto anterior de una sección en corona a través del fémur próximo antes del tratamiento según el método de la presente invención.

55 La figura 10 es una fotografía del aspecto posterior de la sección en corona a través del fémur próximo mostrado en la figura 9, después del tratamiento según el método de la presente invención.

La figura 11 es una fotografía de las secciones mostradas en las figuras 9 y 10, lado a lado, que demuestra la eficacia del tratamiento según la presente invención para eliminar sustancias endógenas y para la limpieza profunda y penetrante de los implantes.

60 Ejemplo 5

Demostración de la capacidad del procedimiento de la presente invención para lograr una interpenetración profunda de sustancias limpiadoras y la impregnación de implantes con sustancias activas biológicamente deseables

65 La figura 12 es una microfotografía de una osteona procedente de hueso cortical sin tratamiento con colorante fluorescente de fluoroisotiocianato (FITC) (aumento de 100X).

ES 2 281 980 T3

La figura 13 es una microfotografía de una osteona procedente de hueso cortical después de la inclusión de FITC en una de las disoluciones limpiadoras de la presente invención, que demuestra la interpenetración profunda del colorante en los intersticios más pequeños del hueso - indicando las áreas verdes brillantes estructuras que contienen FITC, incluyendo el gran canal haversiano (margen derecho) y las lagunas satélites más pequeñas (área central; aumento de 5 100X).

Estas microfotografías demuestran que el colorante de FITC es forzado a introducirse en los intersticios más pequeños del implante, revelando de ese modo la capacidad para lograr una limpieza penetrante profunda. Además, estas 10 microfotografías demuestran que se pueden embeber eficazmente y de forma profunda en materiales del implante sustancias biológicamente activas, tales como antibióticos, compuestos antivirales, compuestos antiinflamatorios, factores de crecimiento, sustancias inductoras de huesos (por ejemplo, proteína morfogenética ósea, proteína morfogenética derivada de cartílago, natural o recombinante, y similar), cuando se incluyen en disoluciones empleadas según el método 15 de la presente invención. De este modo, las sustancias biológicamente activas para la permeación en implantes según el método de la presente invención se seleccionan de entre el grupo constituido por proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento tisular beta o un miembro de la familia de factor de crecimiento tisular beta de factores de crecimiento, proteínas I o II morfogenéticas derivadas de cartílago, o ambas, y cualesquiera factores de crecimiento derivados de cartílago relacionados, factores angiogénicos, factor de crecimiento derivado de plaquetas. Cualquiera de 20 las proteínas seleccionadas para la permeación en implantes puede ser una proteína natural o recombinante.

20 Ejemplo 6

Procedimiento para producir un hueso con antigenicidad reducida

Se pone en contacto, a una presión cíclica elevada y reducida, durante 20 minutos, una disolución de 0,1 a 0,5 25 N de ácido acético u otro ácido suave (EDTA, cítrico, fórmico, HCl diluido, H_3PO_4 , etc.). Esto elimina el 2-3% del calcio del hueso, haciendo que el módulo descienda para el aumento de resistencia (torsional y de cizallamiento), y expone parte del colágeno de forma que se puedan unir más fácilmente los factores de crecimiento. También ayuda a eliminar parte de la proteína unida al mineral. Finalmente, se ha demostrado que la desmineralización reduce la 30 inmunogenicidad del hueso. Al hueso así tratado se le elimina la grasa con 99% de isopropanol, hexano o similar, en un tratamiento de presión cíclica como se describe previamente, seguido de TNBP/Triton X-100, urea, GuHCl, o similar, seguido de varios ciclos de aclarado y de la adición de factores de crecimiento, ácidos nucleicos, o similares. El implante así tratado se implanta entonces directamente, o se congela o liofiliza para la implantación subsiguiente.

El tratamiento del injerto en esta etapa o en una etapa diferente del procedimiento con ácido acético u otro ácido 35 (ácido acético, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido butírico, o sus mezclas) es útil para producir un injerto de hueso ligeramente desmineralizado, de antigenicidad reducida, con efectos concomitantes sobre la resistencia del injerto, la capacidad de unión a factores de crecimiento, la capacidad para la resorción, la eliminación de proteínas solubles ácidas y colágenos débilmente asociados, y otras reducciones 40 de la antigenicidad. Se ha descubierto que la reducción del contenido mineral entre aproximadamente 0 hasta aproximadamente 25%, o entre aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10%, o incluso tan poco como 1% hasta 5%, en comparación con el contenido mineral óseo normal, confiere ventajas significativas sobre la composición ósea de antigenicidad reducida. El principio conductor en el nivel de desmineralización que se debe realizar es eliminar tanto mineral como sea posible, sin al mismo tiempo reducir la resistencia compresiva del hueso. A fin de lograr una desmineralización limitada y uniforme, el hueso se pone en contacto preferentemente, durante aproximadamente treinta 45 minutos, con ácido, por ejemplo ácido acético al 1%, introduciéndose el ácido en una cámara vacía que contiene el hueso, de forma que se produzca la penetración uniforme del ácido. Si se usan ácidos inorgánicos, por ejemplo HCl, se debe de reducir la fuerza del ácido o el período de contacto con el ácido, para evitar la completa desmineralización del hueso. Se ha encontrado que la eliminación limitada de incluso tan poco como 1-2% del contenido mineral normal del hueso da como resultado una mayor predicción (una dispersión reducida de las medidas de esfuerzo de cizallamiento) 50 en la resistencia de los injertos de hueso así tratados. Los beneficios adicionales de este tratamiento incluyen la disolución de proteínas solubles ácidas, la eliminación eficaz de SDS o de otros disolventes iónicos o contaminantes, la unión mejorada de factores de crecimiento, la reducción del tiempo para remodelar el hueso implantado, y la reducción adicional de la antigenicidad.

55 Ejemplo 7

Esterilización mejorada con la implementación del método de la presente invención

Una primera etapa esencial al desarrollar tejidos de aloinjerto que son capaces de evitar la infección suministrando 60 una dosis profiláctica de antibiótico es la minimización de la biocarga contenida en el injerto. Los factores que son capaces de potenciar la perfusión del tejido también son beneficiosos en la fase de carga del fármaco de la producción. Sin embargo, estas etapas no se deben de implementar sin la investigación de sus efectos sobre la resistencia del injerto. Los siguientes datos resuelven los problemas de esterilización, perfusión del fármaco, los efectos biomédicos 65 del tratamiento, y proporcionan datos que se refieren a los perfiles de liberación del fármaco. Juntos, estos estudios demuestran la factibilidad del procedimiento de la presente invención.

ES 2 281 980 T3

Cálculo del valor D para peróxido de hidrógeno al 6% con energía ultrasónica

La mayoría de los procedimientos de esterilización son perjudiciales para las propiedades estructurales y/o biológicas del hueso de aloinjerto (Rasmussen TJ, Feder SM, Butler DL, Noyes FR. The effects of 4 Mrad of gamma irradiation on the initial mechanical properties of bone-patellar tendon-bone grafts. *Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 1994; 10:188-197; Thoren K, Aspenberg P. Ethylene oxide sterilization impairs allograft incorporation in a conduction chamber. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1995; 318:259-264; USFDA. Required Biocompatibility Training and Toxicology Profiles for Evaluation of Medical Devices. Rockville, MD: Department of Health and Human Services, Center for Biologics Evaluation and Research; 1995). Por lo tanto, un procedimiento de esterilización con un efecto mínimo sobre estas propiedades sería beneficioso en la producción de aloinjertos cargados de fármaco. Se ha sugerido que la energía ultrasónica potencia los efectos bactericidas y esporicidas del peróxido de hidrógeno (Block S. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 4^a ed. New York: Lea y Feiberger; 1991). En este estudio, se calculó una reducción en el valor D para la espora de *Bacillus sterothermophilus* (10^6) para muestras tratadas con H_2O_2 al 6% en presencia y en ausencia de energía ultrasónica. Esta espora se escogió debido a su resistencia bien caracterizada y aceptada frente a la esterilización con peróxido. Las muestras se trajeron con 2 ml de H_2O_2 al 6% a 45°C durante un intervalo dado de tiempo, y la reacción se detuvo por adición de agua estéril, y se transfirió a caldo de soja de tripticasa para cultivo a 56°C. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla III. Comparación de la inactivación de esporas con peróxido de hidrógeno al 6% en presencia y en ausencia de energía ultrasónica. Los resultados positivos (+) se identificaron por turbidez del medio, y se confirmaron subcultivando el caldo a medios sólidos. Los resultados negativos (-) se determinaron por los medios que conservan una claridad a lo largo de siete días de incubación.

Tratamiento	Tiempo de tratamiento (min.)						Valor aprox. de D
	0	5	10	15	20	30	
Ultrasónidos	+	+	+	-	-	-	-
Sin ultrasónidos	+	+	+	+	+	+	<1,66

ES 2 281 980 T3

El valor D obtenido para las muestras analizadas en presencia de energía ultrasónica fue 0,83-1,66 minutos (Tabla III). Esto se comparó favorablemente con el valor D obtenido para las muestras analizadas en ausencia de energía ultrasónica (> 10 min.). Esta reducción en el tiempo requerido para la inactivación de esporas permite un método práctico para esterilizar aloinjertos sin afectar adversamente sus propiedades deseadas.

5

Efectos de lípidos residuales sobre la actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno

Este estudio examinó el potencial de los lípidos residuales portados por el tejido de aloinjerto humano para reducir la eficacia del peróxido de hidrógeno a la hora de inactivar las esporas de *Bacillus steroetherophilus*. Se retiraron 10 quirúrgicamente fémures y tibias completas de donantes de hueso humanos ya cadáveres, y se les despojó del tejido blando extraño. El tejido óseo se molvió entonces produciendo una suspensión de hueso fina, con la consistencia de una pasta oleosa. Se retiró una sección de esta pasta ósea, y se limpió a conciencia de contenido de grasa residual, usando acetona tibia (45°C). La suspensión de hueso limpia se mezcló con la pasta de hueso sin tratar, en diversos pesos, para producir muestras que contienen 0, 10, 30 y 60% de grasa residual. Todas las muestras se verificaron usando una 15 extracción exhaustiva con líquido (hexano), con análisis gravimétrico. Se añadió un gramo de cada muestra a tubos de ensayo que contienen 10^6 inóculos de espora, y se trató con 2 ml de peróxido de hidrógeno al 6% (40°C) en presencia de energía ultrasónica (45 KHz), para múltiples puntos de tiempo. Cada punto de tiempo se ensayó por triplicado. La reacción se detuvo durante un punto de tiempo dado mediante adición de 20 ml de agua estéril, y el inóculo se transfirió a caldo de soja de tripticasa para una incubación durante siete días a 56°C. El caldo se determinó por la presencia de 20 turbidez. Los controles incluyeron agua estéril (control negativo), control de agua inoculada (control positivo), y H_2O_2 sin tejido de hueso.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla IV. Valores D aproximados para *B. stenorhophilus* como función del contenido de grasa residual que queda en una suspensión de hueso homogeneizada, cuando se esteriliza en una disolución de peróxido de hidrógeno al 2% a 42°C en presencia de energía ultrasónica. Los resultados positivos (+) se identificaron por turbidez de los medios, y se confirmaron subcultivando el caldo a medios sólidos. Los resultados negativos (-) se determinaron por los medios que conservan la claridad durante los siete días de incubación.

Tratamiento	Tiempo de tratamiento (min.)						Valor aprox de D
	0	5	10	15	20	30	
Control neg.	-	-	-	-	-	-	-
Control pos.	+	+	+	+	+	+	ND
Sin hueso	+	+	+	-	-	-	> 10
0% de grasa	+	+	+	+	-	-	1,66
10% de grasa	+	+	+	+	-	-	2,5
30% de grasa	+	+	+	+	-	-	3,33
60% de grasa	+	+	+	+	-	-	3,33
					-	-	6,66

ES 2 281 980 T3

Los resultados del estudio indican que los lípidos prolongan el tiempo de contacto requerido para la inactivación completa de esporas de *B. sterothermophilus* (Tabla IV). Los datos generados a partir de este estudio demuestran que la eliminación de lípidos endógenos del hueso cortical aumenta la eficacia de la esterilización. Además, reduciendo el tiempo de contacto requerido para la esterilización, se minimizan los efectos potenciales adversos del agente esterilizante (reducción de la resistencia del tejido).

Un modelo para demostrar la eficacia de la esterilización en hueso cortical humano

Definitivamente, la demostración de la eficacia de un procedimiento de esterilización con líquidos para el hueso cortical humano ha sido históricamente difícil. En este experimento se evaluó el uso de un segmento trabajado por medio de una máquina de hueso cortical humano que posee un indicador biológico de *B. sterothermophilus* (10^6), para determinar los usos potenciales para apoyar reivindicaciones de esterilidad del aloinjerto (Fig. 14). El dispositivo se preparó cortando un segmento cortical del borde anterior de la tibia en un donante de hueso masculino joven ya cadáver. Este segmento representa la porción más gruesa del hueso cortical encontrado en el cuerpo, y de este modo es la más difícil de penetrar y esterilizar. Se realizó con una máquina un orificio cilíndrico en el extremo del hueso, longitudinal al eje del hueso. Se obtuvo con una máquina un segundo segmento de hueso cortical en forma de una espiga cilíndrica, ligeramente sobredimensionado en comparación con el diámetro del orificio. Se cortó en la espiga una ranura parcial, permitiendo que se colocase allí un indicador biológico. La espiga se introdujo entonces a la fuerza bajo compresión en el orificio realizado con una máquina, y se expuso al procedimiento de esterilización. También se evaluó un control usando sólo agua estéril, para evaluar si las esporas estaban siendo eliminadas apreciablemente por lavado desde la tira. Además, se usó un colorante trazador para evaluar la ruta del líquido a través del dispositivo.

Los resultados de los controles indican que el grado de eliminación por lavado que se había producido fue mínimo, y no afectó significativamente la biocarga introducida. Las muestras expuestas al proceso de esterilización no demostraron crecimiento después de la incubación durante siete días en TSB, indicando una eficacia en el proceso. Además, la ruta tomada por líquido, según se evalúa por el colorante trazador, fue uniforme y no se infiltró preferentemente en el espacio entre el orificio y la espiga.

Efectos del tratamiento de conservación y esterilización sobre la biomecánica de los aloinjertos

El fin de este estudio fue identificar los efectos de los procesos de conservación y esterilización sobre la resistencia del hueso cortical. Este trabajo es esencial para determinar qué tratamientos son aceptables para el injerto que se expone a ellos durante las etapas de procesamiento y de carga de fármaco de la producción. Se deben de evitar en el procedimiento de preparación del injerto/carga del fármaco los tratamientos que reduzcan significativamente la resistencia.

Se aislaron fémures y tibias de 18 cadáveres humanos diferentes, y se trabajaron con un torno en 203 agujas que tenían un diámetro de 4,0 mm y una longitud de 10 mm. Las agujas se expusieron entonces a tratamiento que se puede usar en la preparación de injertos o en el procedimiento de carga del fármaco. Tras el tratamiento, se determinó la carga última en el fallo bajo compresión axial. El ensayo de compresión axial se adaptó de ASTM D695-91, y se realizó en un aparato de ensayo mecánico servohidráulico MTS 858 (Eden Prairie, MN) (American Society for Testing and Materials. ASTM D 695-91: Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics. Philadelphia, PA: ASTM; 1991).

Los resultados demuestran que la perfusión de peróxido de hidrógeno asistida por presión no redujo la resistencia compresiva de las espigas de hueso cortical (Fig. 15), que muestra grupos de tratamiento y resultados de la resistencia última durante el ensayo de compresión axial: control - se incluyó un grupo que consiste en la ausencia de tratamientos de conservación o de esterilización; liofilización - la liofilización para reducir el contenido de humedad residual del injerto por debajo de 2%; irradiación gamma - una dosis esterilizante de 2,5 Mrad; PAHP - tratamiento con peróxido de hidrógeno asistido por presión, empleado exponiendo el tejido a una disolución al 6% de peróxido de hidrógeno a 40°C durante 30 min. bajo presión oscilante y a energía ultrasónica. Como se puede observar, la irradiación gamma redujo significativamente la resistencia del tejido, y por lo tanto se debería de buscar un método alternativo para la esterilización terminal del injerto.

La liofilización, contrariamente a lo esperado, aumentó significativamente la resistencia axial del tejido. Esto es un resultado prometedor puesto que se teoriza que la liofilización es un componente crítico para maximizar la cantidad de fármaco que se puede cargar en el hueso.

Efectos de los diferenciales de la presión atmosférica sobre la perfusión de hueso cortical

La penetración completa de la matriz interna del hueso cortical es necesaria para la carga homogénea del fármaco. Este estudio examinó la influencia tanto de la presión positiva como negativa sobre la penetración de diversas disoluciones en hueso cortical. Se prepararon cilindros de hueso cortical como se describe anteriormente. Cada cilindro se secó entonces en un horno de vacío durante 24 h a 60°C. Las probetas se pesaron antes de la introducción del agua, y a intervalos regulares durante el ensayo, a fin de determinar su porcentaje de rehidratación. Las condiciones de la reconstitución fueron (1) vacío durante 1 min.; (2) presión positiva durante 1 min.; (3) presión negativa durante 30 segundos, seguido de presión positiva durante 30 segundos; (4) reconstitución a presión atmosférica normal.

ES 2 281 980 T3

El punto de tiempo inicial (2,5 min.) mostró un incremento significativo en la rehidratación tanto para los tratamientos con presión positiva como con presión negativa, según se compara con la presión atmosférica estándar (Fig. 16, panel izquierdo - la rehidratación de hueso cortical en diferentes presiones atmosféricas. Positiva - 100 PSI, negativa - < 25 inHg, Neg/Pos - presión negativa seguida de presión positiva; panel derecho - vista alargada de los puntos de tiempo más iniciales). Además, el tratamiento de negativo a positivo mostró el incremento más grande de la rehidratación, y fue significativo para todos los otros tratamientos en este punto de tiempo. Estos datos demuestran la eficacia de la presión diferencial para inducir la penetración de la matriz del tejido.

10 *Perfiles de liberación de las disoluciones de hueso cortical humano*

Este estudio examinó las velocidades de liberación de compuestos de diversos pesos moleculares a partir de segmentos de hueso cortical estandarizados. Se teorizó que el perfil de liberación de una disolución a partir de hueso cortical seguiría una curva biexponencial que está relacionada con la disposición microarquitectónica de la matriz (Gibaldi M, Perrier D, *Pharmacokinetics*, Marcel Decker, New York, New York, 1982). El objetivo fue proporcionar datos *in vitro* preliminares de cómo el hueso cortical se comporta como una matriz de liberación. Puesto que varios fármacos potenciales de interés son proteínas grandes, se incluyeron los efectos de una proteína de alto peso molecular sobre el perfil de liberación (Gombotz WR, Pankey SC, Bouchard LS, Ranchalis J, Puolakkainen P, *Controlled release of TGF-beta 1 from a biodegradable matrix for bone regeneration*. *J Biomater Sci Polym Ed* 1993; 5(1-2):49-63; Guicheux J, Grimandi G, Trecant M, Faivre A, Takahashi S, Daculsi G, *Apatite as a carrier for growth hormone: in vitro characterization of loading and release*. *J Biomed Mater Res* 1997 Feb; 34(2):165-70).

Los segmentos de hueso cortical se trabajaron por medio de máquina a partir de secciones diafisiarias de fémures y tibias de cadáveres humanos. Los segmentos de hueso se limpian entonces y se impregnaron con compuestos de diversos pesos moleculares. Las muestras se colocaron entonces en baños que mantenían las condiciones de la piel, y se midió la liberación de fármaco a lo largo del tiempo. Además, se examinó histológicamente el patrón de fármaco que queda en la matriz.

Se estudiaron cuatro compuestos de peso molecular variable. 1) FITC (MW = 389 D) a una concentración de 0,05 M en disolución salina tamponada con Tris, con un pH de 8-8,5; 2) complejo de FITC-dextrano (MW = 10 kD) a una concentración de 0,05 M en disolución salina tamponada con Tris, con un pH de 8-8,5; 3) complejo de FITC-dextrano (MW = 20 kD) a una concentración de 0,05 M en disolución salina tamponada con Tris, con un pH de 8-8,5; 4) hemoglobina bovina, Hb (MW = 68 kD), en disolución salina a una concentración de 0,025 g/ml. La cantidad de cada compuesto modelo cargado se determinó mediante la ganancia mísica calculada observada en cada cilindro. El aspecto de los compuestos en el medio circundante se restó de la cantidad cargada, permitiendo que se representase gráficamente un perfil de concentración frente a tiempo que dio el % que queda en el interior de la matriz en el eje y (Figura 17).

Los resultados del hueso impregnado con FITC sin complejear, usando esta preparación, apoyan el modelo propuesto; sin embargo, hubieron limitaciones significativas en este estudio. Sólo el FITC sin complejear se liberó suficientemente rápido de la matriz para reunir datos significativos. La hemoglobina liberada del hueso no se pudo evaluar exactamente debido a la degradación bacteriana (la hemoglobina es una fuente de nutriente potencial para la mayoría de las bacterias). El FITC también se degradó espontáneamente, haciendo difícil el análisis prolongado. Los remedios potenciales para futuros estudios incluyen sistemas cerrados que prohíben la introducción de bacterias, el uso de conservantes antibacterianos, y el uso de compuestos más resistentes a la degradación espontánea.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de perfusión y pasivación para la limpieza de un implante, que comprende someter a un implante contenido en una cámara a una exposición cíclica de aumento y disminución de presión por encima de una atmósfera o por debajo de una atmósfera, o ambos; comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- 10 llenar la cámara con una disolución limpiadora o una mezcla de disoluciones limpiadoras;
- 10 evacuar la cámara;
- 15 presurizar la cámara, y
- 15 realizar un ciclo entre las etapas de evacuación y de presurización durante más de un ciclo y hasta 150 ciclos;
- 20 en el que dicho implante consiste en tejido de aloinjerto o de xenoinjerto, y opcionalmente un material metálico o sintético, o sus combinaciones.
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha exposición cíclica de dicho implante a aumentos y disminuciones de presiones se produce en presencia de una disolución limpiadora.
- 30 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho procedimiento se produce, por lo menos en parte, con la exposición concurrente de dicho implante a energía de ultrasonidos.
- 35 4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho ciclo entre aumentos y disminuciones de presiones se produce rápidamente según un programa definido.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho implante se selecciona de entre el grupo constituido por tejido de aloinjerto o de xenoinjerto seleccionado de: hueso cortical, hueso esponjoso, fascia, articulaciones completas, tendones, ligamentos, duramadre, pericardios, válvulas cardíacas, venas, tejido neuronal, tejido submucosal o cartílago, o sus combinaciones.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de trabajar en una máquina dicho implante hasta las dimensiones finales, si no se ha trabajado previamente en una máquina.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 6, que comprende además la etapa de llevar a cabo el procedimiento usando más de una disolución limpiadora.
- 45 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el procedimiento se realiza a temperaturas elevadas o reducidas con respecto a la temperatura ambiente.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, que comprende además colocar dicho implante en un envase estéril, cerrable herméticamente, y realizar una etapa de descontaminación de la superficie antes a o después de cerrar herméticamente dicho envase.
- 50 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho implante es un tejido derivado de un único donante.
- 50 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho tejido se reúne con tejido tratado de forma similar de por lo menos algún otro donante, y se limpia posteriormente usando la misma disolución limpiadora o disoluciones limpiadoras diferentes.
- 55 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicha disolución limpiadora se selecciona de entre el grupo constituido por peróxido de hidrógeno al 6%, hipoclorito de sodio al 1%, urea 6 M, hidrocloruro de guanidina 4 M, hidróxido de sodio 1 N, isopropanol, agua, disolución salina, y sus mezclas.
- 55 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho procedimiento se realiza a una temperatura entre aproximadamente 37 grados centígrados y aproximadamente 80 grados centígrados.
- 60 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho procedimiento se realiza a aproximadamente 50-60 grados centígrados.
- 60 15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho implante es un tejido derivado de una reunión de tejidos de donantes.
- 65 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho tejido se reúne con tejido tratado de forma similar procedente de por lo menos algún otro donante, y se limpia usando la misma disolución limpiadora o disoluciones limpiadoras diferentes.

ES 2 281 980 T3

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicha disolución limpiadora se selecciona de entre el grupo constituido por peróxido de hidrógeno al 6%, hipoclorito de sodio al 1%, urea 6 M, hidrocloruro de guanidina 4 M, hidróxido de sodio 1 N, isopropanol, agua, disolución salina, y sus mezclas.
- 5 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicho procedimiento se realiza a una temperatura entre aproximadamente 37 grados centígrados y aproximadamente 80 grados centígrados.
- 10 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho procedimiento se realiza a aproximadamente 50-60 grados centígrados.
- 15 20. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha disolución limpiadora se selecciona de entre el grupo constituido por: agua estéril, Triton X-100, TNBP, peróxido de hidrógeno al 3%, un alcohol miscible en agua, disolución salina, povidona yodada, disolución de ácido ascórbico, hidrocarburos aromáticos o alifáticos, éteres, cetonas, aminas, urea, hidrocloruro de guanidina, ésteres, glucoproteínas, proteínas, sacáridos, enzimas, ácidos o peróxidos gaseosos, y sus mezclas.
- 20 21. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el implante tratado de este modo se envasa en un entorno estéril al realizar una etapa de descontaminación de superficie o terminal, preferentemente con el implante en su envase final.
- 25 22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicha etapa de descontaminación de la superficie o terminal comprende poner en contacto el implante con H_2O_2 en fase de vapor, ácido peracético, exposición a radiación gamma, radiación con haces de electrones, exposición a óxido de etileno, o una mezcla de estos.
- 25 23. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de presurización comprende presurizar la cámara hasta una presión por encima de una atmósfera, y la etapa de evacuación comprende evacuar la cámara hasta una presión por debajo de una atmósfera.
- 30 24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que se emplean presiones de vacío entre aproximadamente 8,0 y 13,3 kPa, y presiones de vapor de las disoluciones en contacto con el implante y presiones de relleno entre aproximadamente 0,61-1,01 MPa, y en el que el tratamiento con ultrasonidos concurrente se produce durante todas las etapas o en etapas específicas en dicho ciclo de presiones.
- 35 25. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el implante se perfunde o se reviste con una sustancia bioactiva.
26. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que dicha sustancia bioactiva es un fármaco o un factor de crecimiento.
- 40 27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que dicho factor de crecimiento se selecciona de entre el grupo constituido por una proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento tisular beta o un miembro de la familia de factores de crecimiento tisular beta de factores de crecimiento, proteínas I o II morfogenéticas derivadas de cartílago, o ambas, y cualesquiera factores de crecimiento derivados de cartílago relacionados, factores angiogénicos, y factor de crecimiento derivado de plaquetas, o factores de crecimiento que codifican activamente ácidos nucleicos, DBM hidratada finamente molida, médula ósea o extracto de médula ósea, o sus mezclas.
- 45 28. Procedimiento según la reivindicación 1, que da como resultado cualquiera o todos de entre:
- 50 (a) una reducción entre aproximadamente 1 a 12 log en la contaminación bacteriana;
- (b) una reducción entre aproximadamente 1 a 15 log en la contaminación con virus de cubierta;
- (c) una reducción de hasta aproximadamente 5 log en la contaminación con virus sin cubierta;
- 55 (d) una reducción entre aproximadamente 2 a 10 veces en endotoxina;
- (e) mantenimiento de las propiedades biológicas y biomecánicas del implante o del injerto;
- (f) ausencia de toxicidad del tejido debido a las disoluciones limpiadoras usadas; y
- 60 (g) antigenicidad reducida del implante.
29. Procedimiento de perfusión y pasivación para la limpieza de implantes según se describe en la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende el tratamiento con ultrasonidos durante todas las etapas o en etapas específicas de dicho ciclo de presiones.
- 65 30. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que se emplean presiones por debajo de 101 kPa hacia abajo hasta 8 kPa, y presiones por encima de 101 kPa hasta 1,01 MPa.

ES 2 281 980 T3

31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que las presiones por debajo de 101 kPa (1 atmósfera) están entre aproximadamente 8,0 hasta 13,3 kPa (60 a 100 torr), y las presiones por encima de 101 kPa (1 atmósfera) están entre aproximadamente 0,61-1,01 MPa (6 a 10 atmósferas).
- 5 32. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho tejido es hueso que comprende el tratamiento del hueso con ácido, para desmineralizar parcialmente el hueso.
33. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende eliminar lípidos endógenos de un tejido óseo.
- 10 34. Procedimiento según la reivindicación 33, que comprende además liofilizar el tejido óseo así tratado.
35. Procedimiento según la reivindicación 34, que comprende además reconstituir el hueso liofilizado en una disolución que contiene un factor biológicamente activo.
- 15 36. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho implante es hueso, que comprende poner en contacto dicho hueso con ácido acético, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido butírico, o sus mezclas, de tal forma que dicho hueso se desmineralice en un grado entre aproximadamente 0 hasta 25% del contenido mineral normal del hueso, y opcionalmente se reúne, antes, durante o después de dicha puesta en contacto, con tejido óseo tratado similarmente procedente del mismo donante o de la misma especie, o de un donante 20 o especie diferente.
37. Procedimiento según la reivindicación 36, en el que dicho hueso se desmineraliza en un grado entre aproximadamente 1 hasta 10% del contenido mineral normal del hueso.
- 25 38. Procedimiento según la reivindicación 37, en el que dicho hueso se desmineraliza en un grado entre aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5% del contenido mineral normal del hueso.
39. Método para obtener un implante, que comprende combinar tejido o un material tisular o sintético tratado según el método de la reivindicación 1, para formar un implante compuesto.
- 30 40. Método para potenciar la penetración de materiales solubles o disueltos en un implante de tejido, que comprende limpiar los intersticios de dicho tejido sometiendo dicho implante al procedimiento descrito en la reivindicación 1.
- 35 41. Aparato para realizar el procedimiento según la reivindicación 1, que comprende: un controlador lógico programable para activar o desactivar válvulas o solenoides 301 a-h a tiempos predeterminados en el ciclo de limpieza; una cámara de reacción 310 cerrable herméticamente, en la que se coloca un tejido a limpiar; un tanque de mezclamiento químico 330 desde el cual se introducen fluidos limpiadores en dicha cámara de reacción 310 cerrable herméticamente; un tanque receptor 360 de vacío, enlazado a dicha cámara de reacción 310 de forma que se puede aplicar vacío esencialmente instantáneo de cantidades conocidas a la cámara de reacción 310, sin la necesidad de una bomba de vacío para desarrollar gradualmente presión negativa en dicha cámara de reacción 310; una fuente de agua estéril, disolución salina fisiológica, o disolución acuosa similar; un tanque de presión 380 que se presuriza mediante un compresor de gas filtrado, para retener la esterilidad en el tanque de reacción 310.
- 45 42. Instalación para realizar el procedimiento según la reivindicación 1, que comprende por lo menos una cámara 510 de retirada quirúrgica del tejido, en la que el tejido a limpiar es desprovisto de tejidos gruesos, adventicios e indeseados; por lo menos un puerto 515 cerrable herméticamente en una cámara de reacción 310, para la presurización y despresurización cíclicas de dicho tejido en presencia de por lo menos un disolvente limpiador; por lo menos una habitación 530 para la producción de injertos, en la que se realiza el dimensionamiento y el trabajado en máquina de los implantes; por lo menos una cámara de reacción 310' en la que se inserta un implante dimensionado vía por lo menos un puerto 535 cerrable herméticamente, para la presurización y despresurización cíclica de dicho implante dimensionado en presencia de por lo menos una disolución limpiadora; por lo menos un puerto 536 cerrable herméticamente, para la eliminación del implante limpio, y por lo menos una estación 540 de esterilización terminal y de envasado, para el envasado estéril del implante limpio.
- 55

60

65

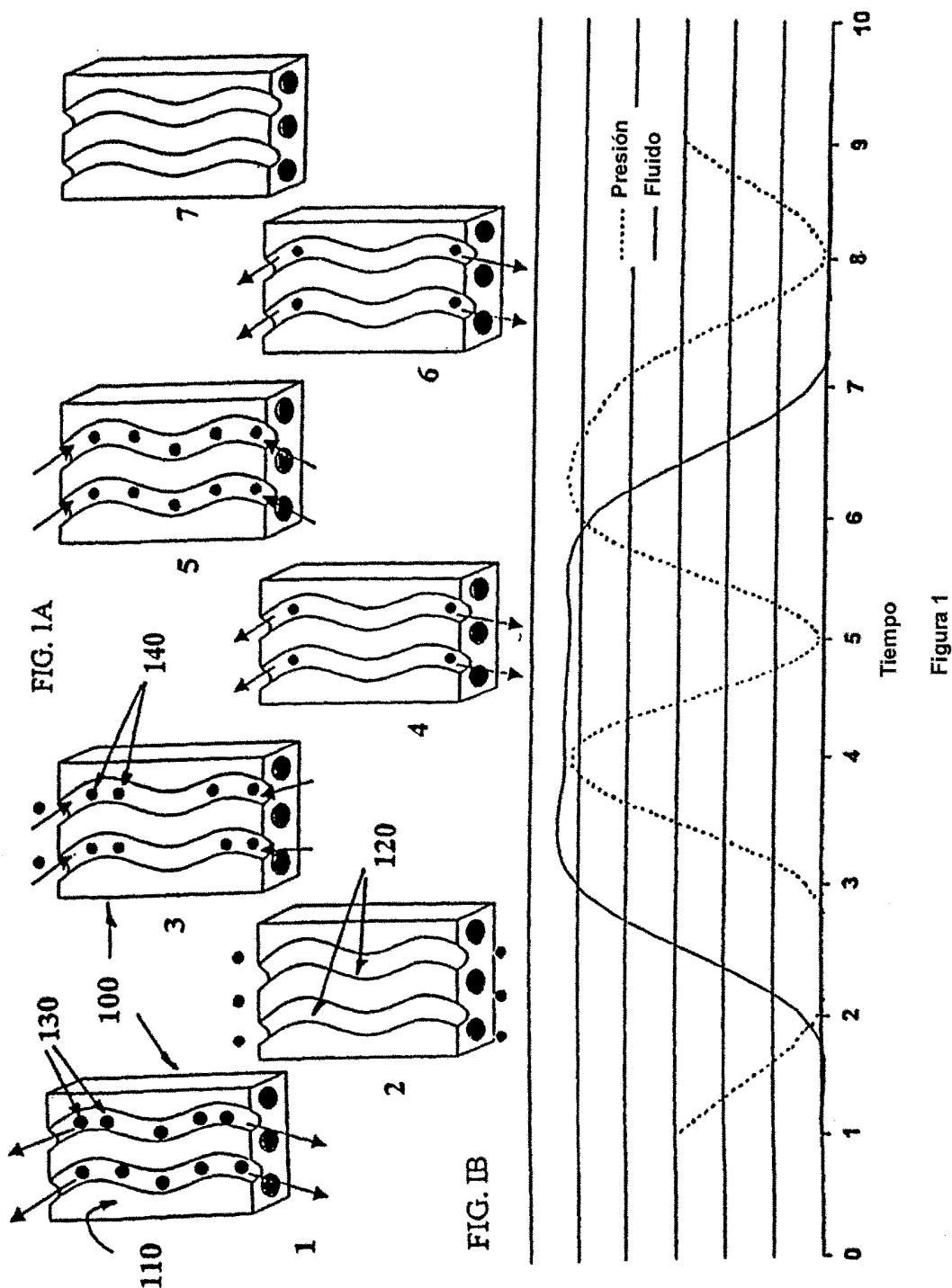


Figura 1

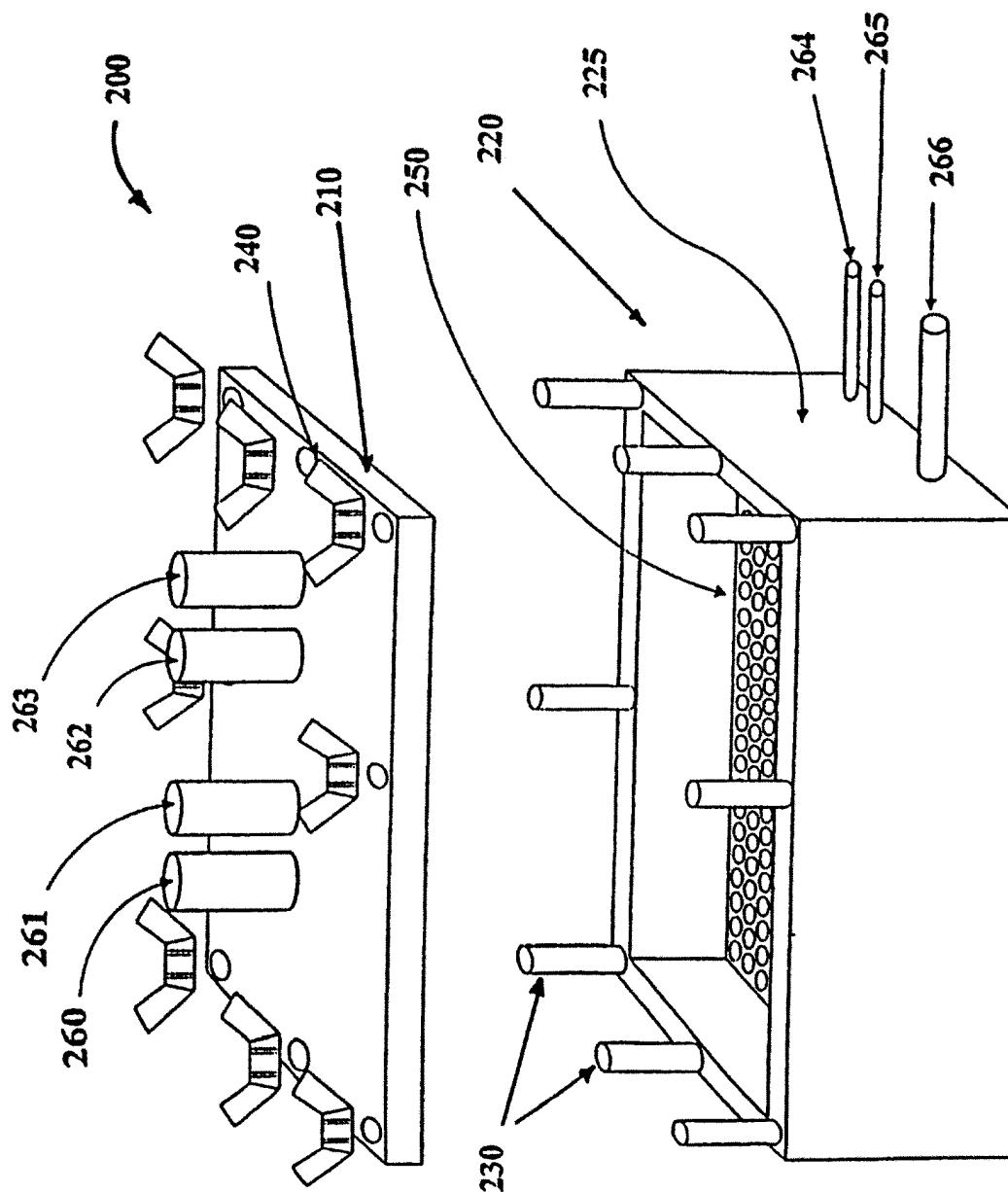


Figura 2

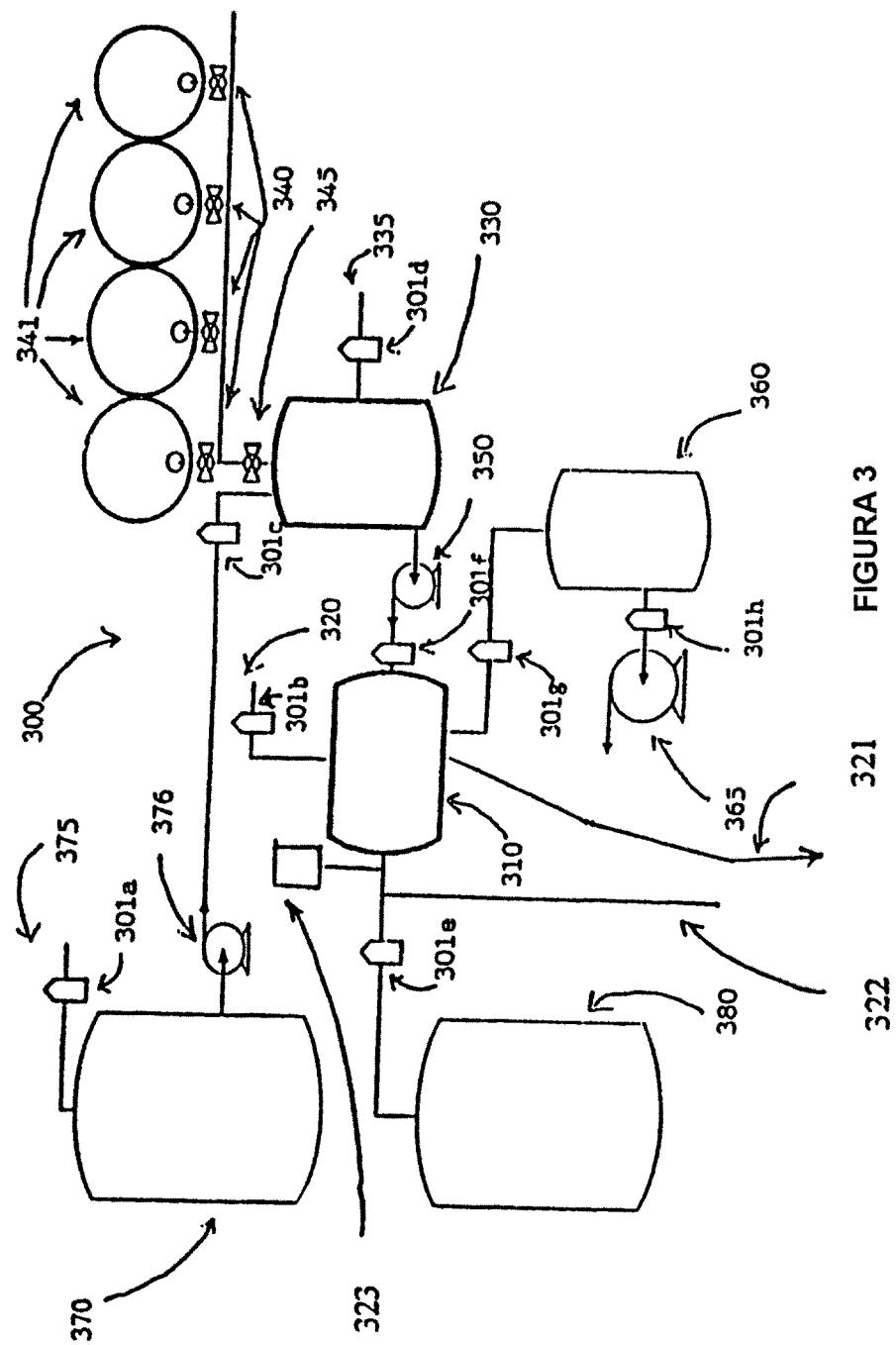


FIGURA 3

321

32

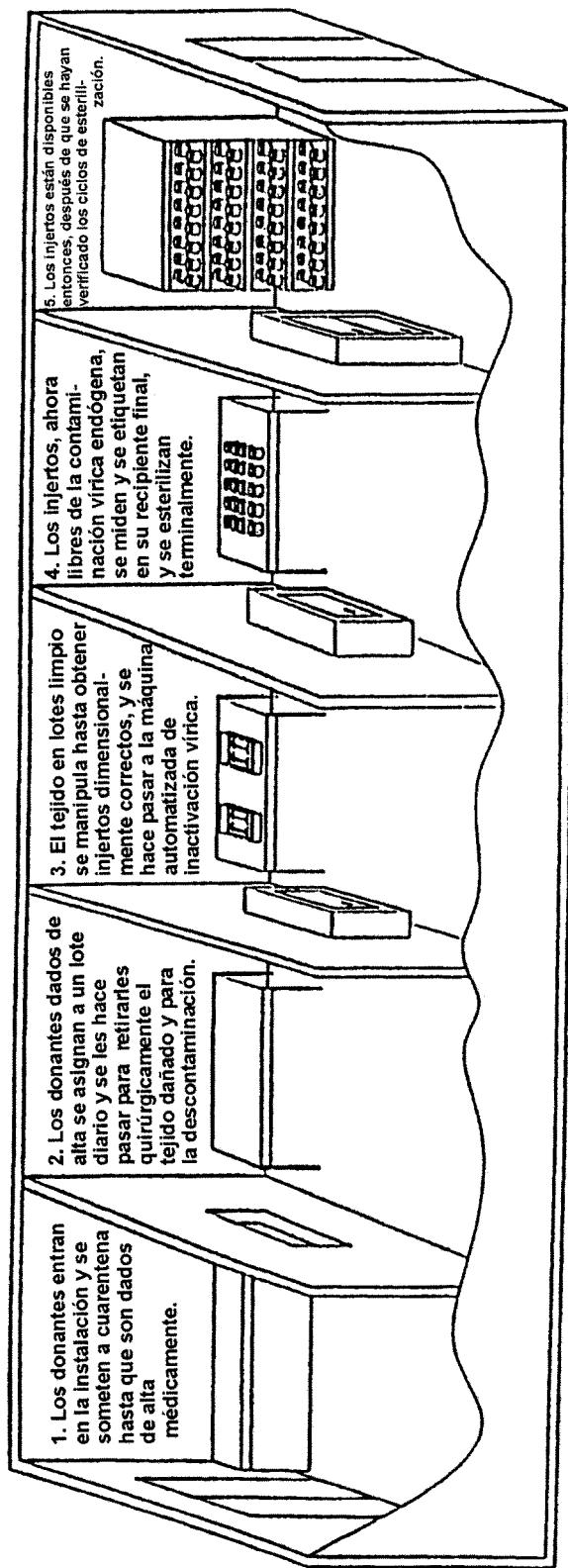


FIGURA 4

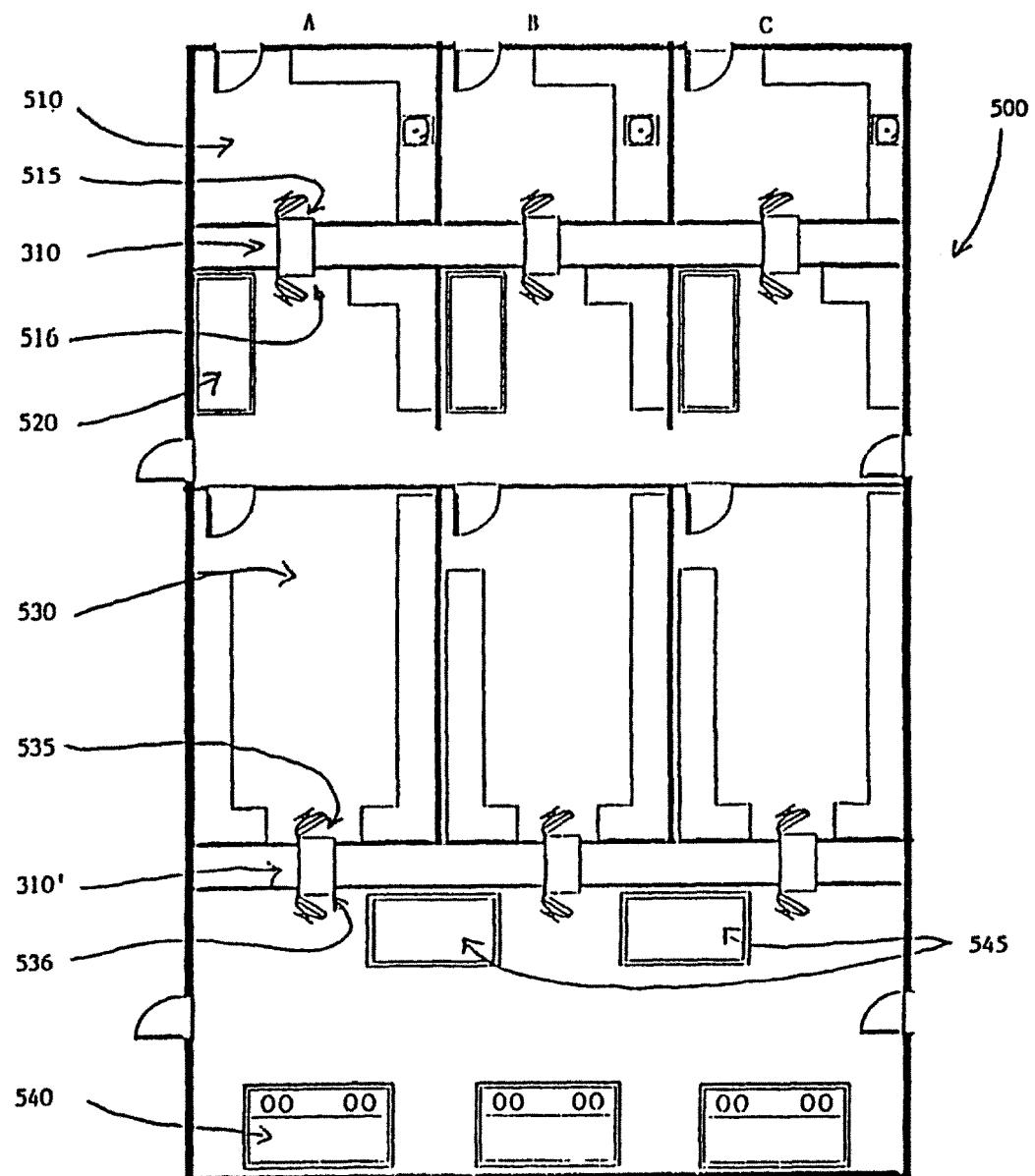


FIGURA 5

ES 2 281 980 T3

FIGURA 6

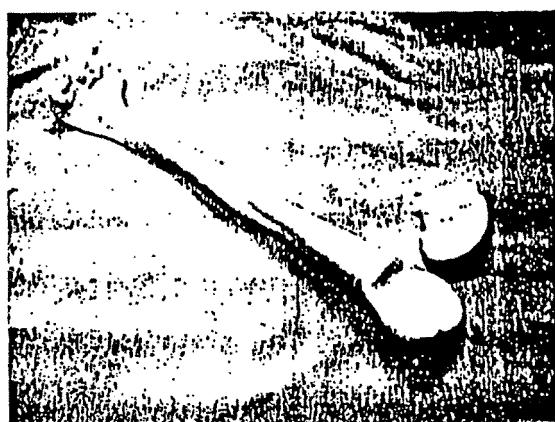
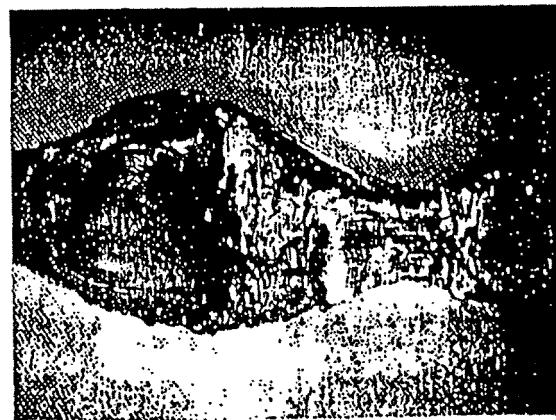


FIGURA 7



FIGURA 8



ES 2 281 980 T3

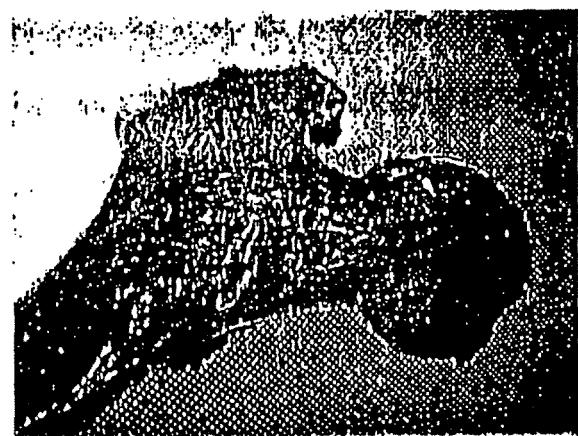


FIGURA 9

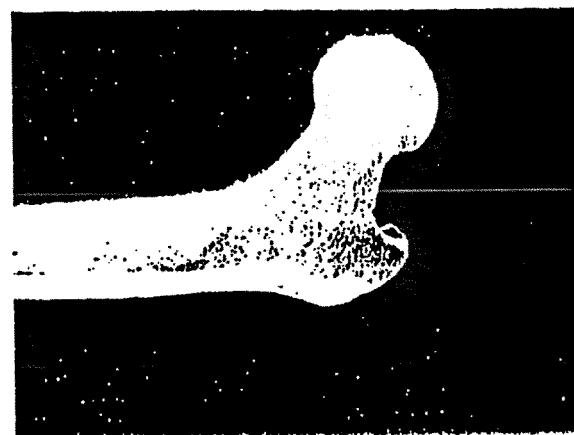


FIGURA 10

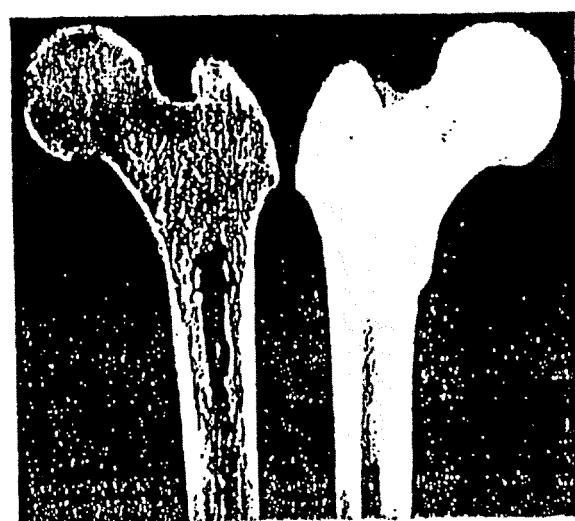


FIGURA 11

ES 2 281 980 T3

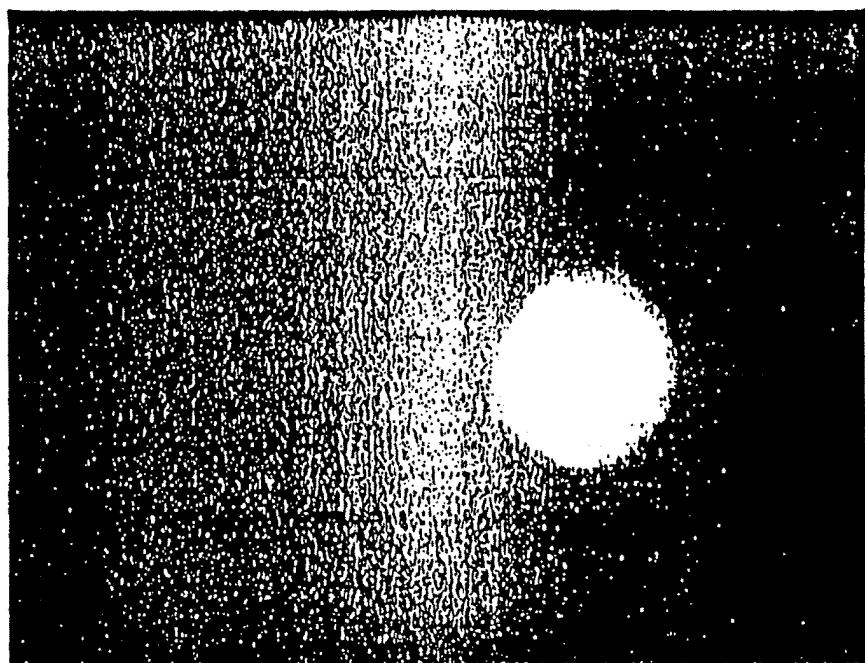


FIGURA 12

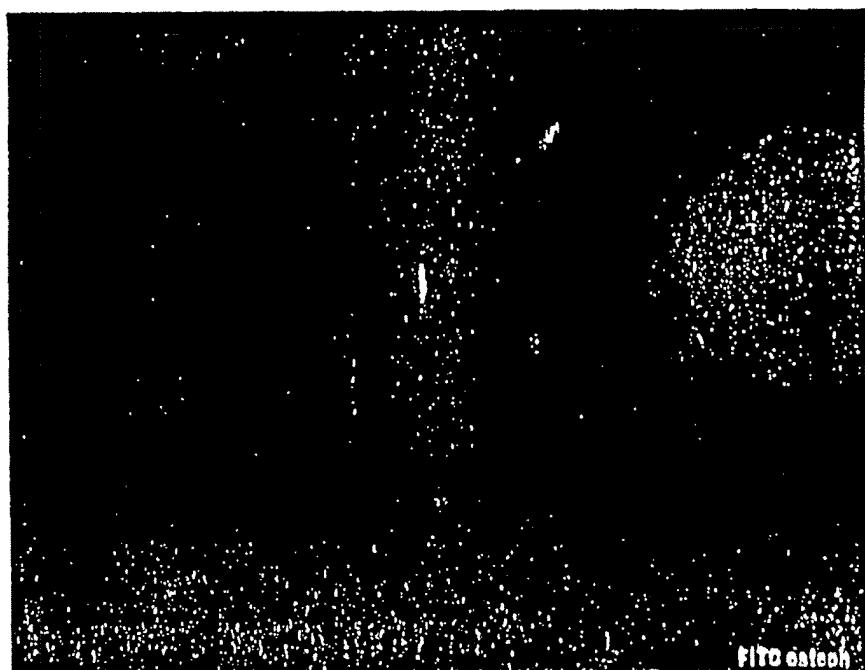


FIGURA 13

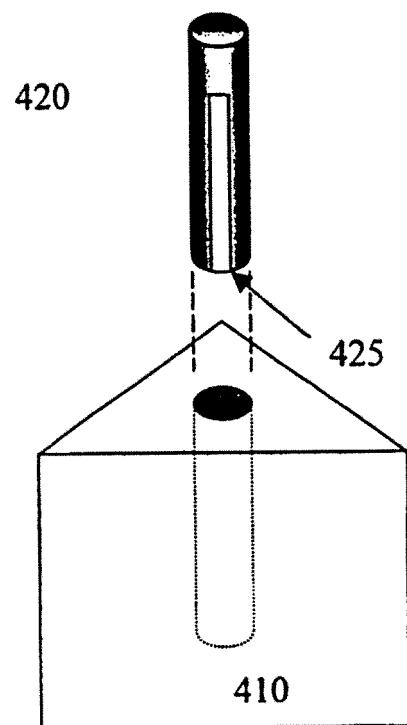


FIGURA 14

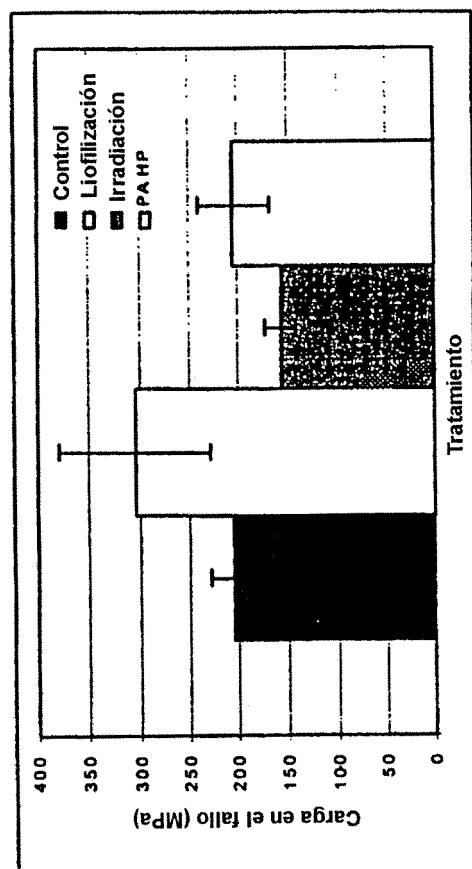


FIGURA 15

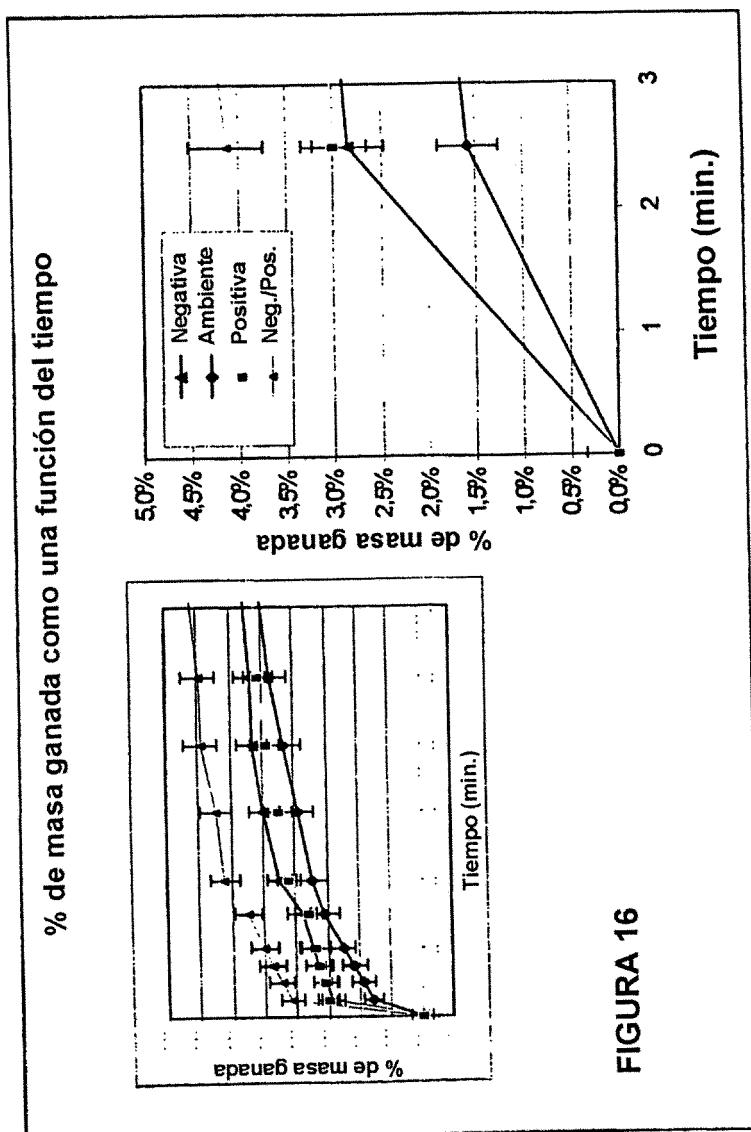


FIGURA 17

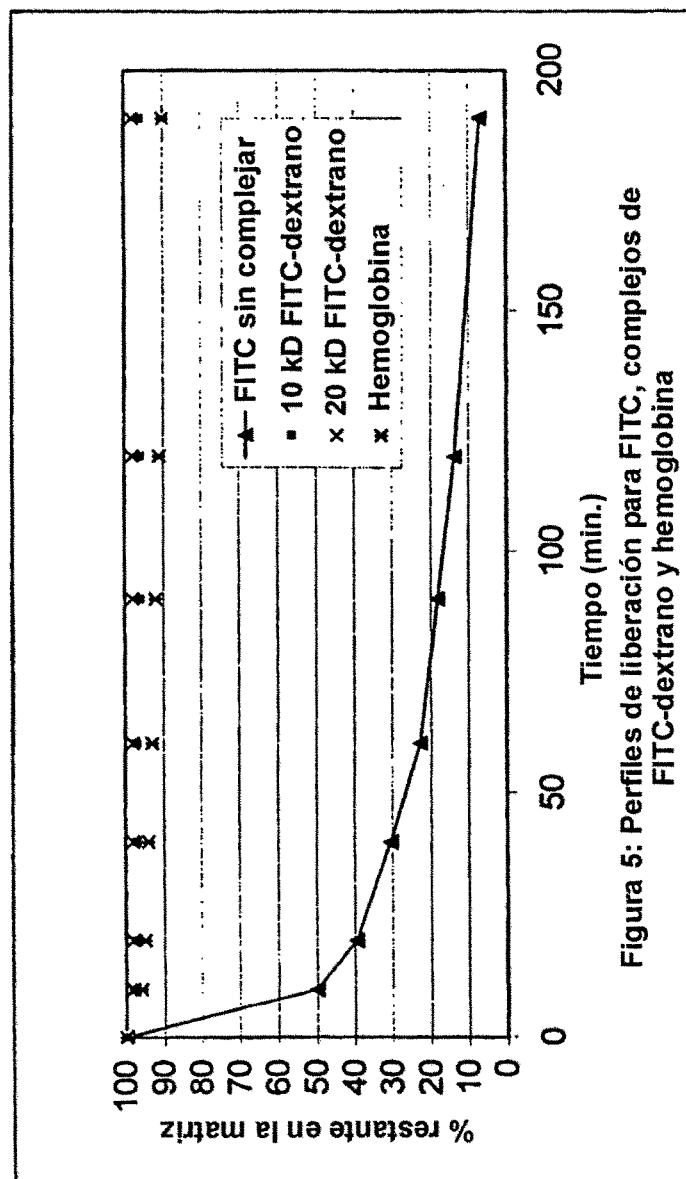


Figura 5: Perfiles de liberación para FITC, complejos de FITC-dextrano y hemoglobina