



La invención se refiere a un procedimiento para preparar un material sustitutivo de huesos, con estabilidad biológica mejorada, a base de colágeno.

5 En cirugía continúa existiendo la necesidad de revestir los defectos de los huesos con un material de relleno. Esto es necesario sobre todo en el caso de heridas por accidentes, que han conducido a fracturas de huesos con pérdida de substancia ósea o dislocación de huesos. No obstante, hay otras numerosas aplicaciones, como por ejemplo relleno de defectos después de la extirpación de tumores óseos o de la extracción de quistes óseos. Además se necesita un material de relleno de huesos en los casos en que el cirujano, en el curso de medidas correctoras, tenga que llenar un espacio hueco ya existente o creado por él mismo en el hueso.

10

15

Según el estado actual de la técnica quirúrgica, el material más adecuado es la parte esponjosa autóloga o una esquirra cortico-esponjosa autóloga (bibliografía: Unfallheilkunde, 81, 565 - 567 (1978)). En este caso el receptor es al mismo tiempo también el donante del hueso.

20

Asimismo es habitual el trasplante de huesos humanos de una persona a otra, el trasplante homólogo. Para ello se han establecido en algunos lugares bancos de huesos, que mantienen a disposición el material adecuado. Además es conocido y habitual el trasplante de huesos animales, que habían sido sometidos a un procedimiento de preparación adecuado, como por ejemplo incorporación y mantenimiento en solución de cialita o por el procedimiento citado en la memoria de patente alemana 961 654.

25

30

Los mejores resultados quirúrgicos en el lu-

gar de injerto, se logran hasta ahora sin ninguna duda cuando se extrae el hueso del mismo paciente que ha de recibir este material (trasplante autólogo). En tal caso resultan dos inconvenientes decisivos:

5 1º.- En este caso el material sustitutivo del hueso tiene que ser obtenido por una operación adicional. La intervención por operación quirúrgica adicional conduce a una prolongación del tiempo total de la operación, lo que es muy desventajoso para el paciente, y en casos aislados incluso puede poner en peligro su vida. Son afectados por ello sobre todo heridos graves, personas ancianas, o personas taradas de antemano por otras enfermedades generales, independientemente de la necesaria intervención quirúrgica. La operación adicional conduce además a una mayor pérdida de sangre y es desagradable para los interesados a causa de los dolores originados. Además de ello, toda intervención quirúrgica tiene un cierto índice de complicaciones, que puede conducir a otras lesiones, no siempre previsibles en cada caso particular.

10  
15  
20 2º.- La cantidad del hueso autólogo de que se dispone es limitada. Los contenedores de reserva disponibles son las crestas iliacas de ambos lados, las costillas, la cabeza de la tibia, y las partes alejadas del radio. Incluso la utilización completa de estas fuentes, que hace necesarias entonces varias intervenciones quirúrgicas, no proporciona en todos los casos una cantidad suficiente de material sustitutivo de huesos. Si la necesidad es mayor, el cirujano está forzado a emplear una

30

cantidad insuficiente de material sustitutivo de huesos, o a recurrir a huesos menos idóneos de otros hombres o de animales.

5 En el caso del trasplante homólogo de huesos de una persona a otra, con frecuencia el trasplante no es bien tolerado por el receptor. De ello es responsable ante todo la formación de anticuerpos contra la albúmina ajena. Además, sólo con dificultad se consigue material donante adecuado. Por regla general hay que recurrir a huesos ex-  
10 traídos de cadáveres, cuyo valor ya está fuertemente disminuído. No se puede excluir la transmisión de infecciones a los receptores.

El empleo de material de trasplante heterólogo, tal como por ejemplo esquirlas de huesos de Kiel según  
15 la memoria de la patente alemana 961 654, demostró en el curso de muchos años que este material no era bien tolerado por algunos pacientes. Los trozos de hueso empleados por el cirujano con frecuencia no eran convertidos en tejido óseo viviente, sino que permanecían en el tejido como ma-  
20 terial muerto.

Por consiguiente la invención se plantea la misión de crear un procedimiento para preparar un nuevo ma-  
25 terial que esté disponible en cualquier cantidad, que no genere ningún anticuerpo en el caso de implantación en el cuerpo de personas o animales, que sea bien compatible con los tejidos, y que después de la implantación en el cuerpo se convierta en tejido óseo.

La invención se refiere al objeto expuesto en las reivindicaciones.

30 Como material de partida para el material sus

titutivo de huesos preparado según la invención sirven huesos, y en especial material óseo de bovinos, por ejemplo de terneros. No obstante se pueden emplear también otros materiales de partida, tales como huesos humanos o material similar que contenga colágeno. A continuación se expone a título de ejemplo el procedimiento para la preparación de material sustitutivo de huesos según la invención, con ayuda de huesos de ternero como material de partida. El procedimiento representa una combinación de diferentes etapas, que tienen que ser llevadas a cabo en la secuencia indicada para obtener el material sustitutivo de huesos según la invención, con estabilidad biológica mejorada.

En una primera etapa, para la eliminación de la hemoglobina y de otras proteínas solubles en agua, los huesos son remojados durante un cierto espacio de tiempo. De preferencia este espacio de tiempo es de 2 - 3 días. Durante este remojado se renueva con frecuencia el líquido de lavado. El remojado se puede llevar a cabo también como remojado con agua circulante. No es necesaria una temperatura especial, pero se remoja convenientemente a la temperatura ambiente.

Una segunda etapa del procedimiento sirve para la eliminación de otros componentes proteínicos insolubles en agua. Es importante que sean eliminadas las albúminas o proteínas extrañas, aparte del colágeno, tales como por ejemplo osteoplastos, para evitar reacciones contrarias por formación de anticuerpos incluso de tipo enzimático. La eliminación de los componentes proteínicos en esta etapa se realiza por introducción del material óseo en un agente de eliminación de proteínas o albúmina, por ejem

plo en una solución de  $H_2O_2$ . Esta solución de  $H_2O_2$  debe tener una concentración superior a 10 %. La duración del tratamiento es normalmente de 2 - 3 días. También aquí la solución tiene que ser renovada varias veces, para garantizar una eliminación completa de los componentes proteínicos.

La tercera etapa del procedimiento consiste de nuevo en una etapa de enjuagado, en la que el material obtenido en la segunda etapa es remojado con agua fría para la extracción por lavado y evacuación de las partes blandas disueltas. Aquí es ventajoso el remojado con agua circulante.

En la cuarta etapa del procedimiento se desengrasa el material así obtenido. El desengrasado se realiza con ayuda de disolventes orgánicos. Disolventes adecuados son por ejemplo acetona o éter, o en especial una combinación de ambos disolventes. El desengrasado puede ser llevado a cabo en cualquier sistema de aparatos adecuado para ello. Para este desengrasado es especialmente adecuado un sistema de aparatos Soxhlet.

En la quinta etapa del procedimiento, el material obtenido en la cuarta etapa se trata con ayuda de formadores de complejos o intercambiadores de iones. Esta etapa sirve para el fin de eliminar por disolución la porción mineral del hueso, mediante la formación de complejos. Formadores de complejos adecuados son por ejemplo las sales de ácido etilendiaminotetraacético.

Una solución adecuada puede ser preparada según un procedimiento indicado en la obra de Romeis "Lehrbuch der mikroskopischen Technik". En tal caso se mezclan

250 g de etilendiaminotetraacetato disódico con 200 ml de agua destilada, y se calienta. Con agitación permanente se añaden 50 ml de una lejía de sosa al 40 por ciento, y el conjunto se completa con agua destilada hasta 800 ml. Por  
5 adición gota a gota de lejía de sosa al 40 por ciento se ajusta a pH 7,4, y se completa a 1000 ml de volumen total con agua destilada.

El material óseo se incorpora en tal solución y permanece en ella durante largo tiempo, por ejemplo has  
10 ta varias semanas, hasta que se forma un producto elástico, con una consistencia a modo de la del caucho.

El producto elástico, a modo de caucho, así obtenido, se lava de nuevo en una sexta etapa del procedi-  
15 miento, para eliminar los restos de sales presentes. El lavado se realiza por remojado con agua circulante durante un espacio de tiempo suficiente, tal como por ejemplo 2 -  
- 3 días.

El material obtenido de este modo es sometido después eventualmente, en una séptima etapa del procedi-  
20 miento, a una liofilización, de modo habitual.

Luego, el material obtenido es sometido, en una octava etapa del procedimiento, a la esterilización habitual, en especial a la esterilización por irradiación. La esterilización por irradiación puede realizarse con do-  
25 sis habituales, por ejemplo con una dosis de 2,5 Megarad.

Mediante el procedimiento combinado antes explicado, las etapas 1 - 4 y la etapa 4 son en sí conocidas como tales. No obstante, según la memoria de patente ale-  
30 mana 961 654, después de la etapa de trabajo 3 está intercalada una etapa de secado, que se lleva a cabo como máxi-

mo a 40°C durante un espacio de tiempo de 12 - 24 horas.  
En el caso del presente procedimiento esta etapa de secado no debe ser empleada, puesto que de otro modo no se llega al resultado según la invención. Es también esencial que  
5 después de la etapa 3 del procedimiento, es decir del remo-  
jado, se lleve a cabo, sin ninguna etapa de secado, la eta-  
pa de trabajo 4 conocida de por sí, es decir el desengrasa-  
do con disolventes orgánicos.

La etapa 5 del procedimiento es conocida como  
10 tal, por ejemplo por la citada obra "Lehrbuch der mikrosko-  
pischen Technik" de Romeis. Por el contrario no es conocida  
la combinación de las etapas 1 - 4 del procedimiento de la  
presente solicitud de patente con la etapa 5 del procedi-  
miento de la solicitud de patente.

15 En el caso de las etapas 6 - 8 del procedi-  
miento se trata de etapas de procedimiento habituales, co-  
nocidas de por sí. Sin embargo, tampoco son conocidas es-  
tas etapas en combinación con las etapas 1 - 5 del procedi-  
miento de la presente solicitud de patente.

20 Por medio de la combinación según la inven-  
ción de las etapas individuales del procedimiento, tomadas  
como tales, conocidas de por sí, se ha hecho posible obte-  
ner un material sustitutivo de huesos a base de colágeno  
purificado, y en especial de colágeno de ternero purifica-  
25 do, que por evitación cuidadosa de todos los factores per-  
judiciales, como por ejemplo ácidos en el proceso de des-  
calcificación, se obtiene ampliamente en su estructura mo-  
lecular.

30 El material de base así obtenido, en la im-  
plantación en el cuerpo como material sustitutivo de hue-

—sos, presenta propiedades sorprendentemente buenas. Por ejemplo el tiempo de resorción es esencialmente más elevado que con otros materiales conocidos hasta ahora.

Además de ello las investigaciones de tejidos finos, que fueron extraídos a diferentes intervalos de tiempo después de implantación en animales de experimentación, han demostrado una sobresaliente compatibilidad sin reacciones de rechazo. Ya después de 14 días se pudo reconocer una transformación incipiente en tejido óseo. Las investigaciones de tejido fino mostraron inclusiones de sustancia mineral, células de tejido conjuntivo, vasos sanguíneos nacientes y osteoblastos.

El material de base obtenido del modo anterior puede ser aún esencialmente mejorado en sus sobresalientes propiedades como material sustitutivo de huesos, cuando este material se mezcla con una pequeña cantidad de la hormona calcitonina, llamada también tireo-calcitonina. Por ejemplo son adecuadas para ello las soluciones de calcitonina obtenibles en el comercio. Los resultados esencialmente mejorados permiten obtener la conclusión de que en este caso se trata de un efecto sinérgico entre el material de base sustitutivo de huesos y la hormona calcitonina. El tiempo de regeneración del hueso se pudo acortar considerablemente aún más con un material sustitutivo de huesos mezclado con calcitonina, de este tipo.

La invención se ilustra a continuación con ayuda de un ejemplo de realización:  
1 kg de huesos de ternero (trozos de la parte esponjosa) se lava cuidadosamente y se libera de restos gruesos de sangre. Luego, esta cantidad de huesos se dispone en un reci-

5 piente adecuado, con posibilidad de alimentación y evacuación, y se expone durante 72 horas a un enjuagado continuo con agua corriente circulante. Luego se incorpora durante 72 horas en una solución de  $H_2O_2$  (al 15 %). La solución se cambia 3 a 4 veces. Se repite después durante 24 horas el tratamiento con agua corriente circulante. A continuación se lleva a cabo el desengrasado en un sistema de aparatos Soxhlet con 60 % de acetona y 40 % de dietiléter, durante aproximadamente 12 horas.

10 1250 g de etilendiaminotetraacetato disódico se mezclan con 1000 ml de agua destilada, y se calientan. Con agitación permanente se añaden 200 ml de NaOH (al 40 %) y el conjunto se completa con agua destilada hasta 4000 ml. Por adición gota a gota de NaOH al 40 por ciento se ajusta a pH 7,4, y se completa a 5000 ml con agua destilada.

15 En la solución así obtenida se incorporan los huesos tratados como se ha descrito anteriormente, hasta que varias muestras extraídas se manifiestan como exentas de minerales. Para ello, según el tamaño de los trozos individuales son necesarias, aproximadamente 3 - 4 semanas a temperatura ambiente.

20 Después se lleva a cabo de nuevo un desengrasado con 60 % de acetona y 40 % de dietiléter en un sistema de aparatos Soxhlet durante aproximadamente 12 horas. A continuación se liofiliza. Luego, después de un envasado adecuado en láminas, se esteriliza por irradiación con 2,5 Mrad. Seguidamente se describen experiencias y sus resultados, en las que se implantó el material sustitutivo de huesos preparado según la invención.

30 El material sustitutivo de huesos preparado

-según la invención se ensayó en cuanto a sus propiedades en ratas y en conejos.

La matriz de colágeno se implantó bajo la piel y en la musculatura dorsal de los animales. En diferentes grupos se extrajeron las implantaciones al cabo de 5 1, 2, 4, 8 y 12 semanas, y se investigaron histológicamente.

Al cabo de 1 semana ya era reconocible el crecimiento de finísimos vasos sanguíneos y de células.

10 Al cabo de 14 días se pudieron reconocer condroblastos, fibroblastos y osteoblastos (células cartilaginosas, de tejido conjuntivo y formadoras de huesos). En el curso posterior se realizó una asimilación y reconstrucción, hasta la formación de estructuras óseas regulares.

15

20

25

30

= REIVINDICACIONES =

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Procedimiento para la preparación de material sustitutivo de huesos, con estabilidad biológica mejorada, a base de colágeno, caracterizado porque a) a partir de material natural que contiene colágeno, tal como huesos, se elimina la hemoglobina y otras proteínas solubles en agua, por tratamiento repetido con agua, b) a partir del material obtenido en la etapa a) se eliminan albúmina y proteínas por tratamiento repetido con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c) el material obtenido en la etapa b) se enjuaga con agua fría, d) el material obtenido en la etapa c) se desengrasa con disolventes orgánicos, e) el material obtenido en la etapa d) se trata con formadores de complejos o intercambiadores de iones, para la extracción por disolución de las porciones minerales del material de colágeno, f) el material obtenido en la etapa e) se trata por remojado con agua circulante para la eliminación de las sales residuales, g) el material obtenido en la etapa f) se liofiliza eventualmente de modo habitual, y h) el material obtenido se esteriliza de modo habitual, en especial con ayuda de irradiación, obteniéndose un material consistente en colágeno natural, que se obtiene ampliamente en su estructura molecular.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque como material de partida se emplea

material óseo de bovinos, por ejemplo huesos de terneros.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el material obtenido se mezcla adicionalmente con la hormona calcitonina.

5 4ª.- Procedimiento para la preparación de material sustitutivo de huesos.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de doce hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14. DIC. 1979

P.A.

Alberto de Elzaburu  
Por Poder, 

15

20

25

30