



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011108938/15, 10.03.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.03.2011

(45) Опубликовано: 20.07.2012 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2172104 C1, 20.08.2001. RU 2278655 C1,
27.06.2006. RU 2326680 C1, 20.06.2008.

Адрес для переписки:

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, ФГБУ
"НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи"
Минздравсоцразвития России

(72) Автор(ы):

Лунин Владимир Глебович (RU),
Карягина-Жулина Анна Станиславовна (RU),
Шарапова Наталья Евгеньевна (RU),
Ершова Анна Степановна (RU),
Громов Александр Викторович (RU),
Никитин Кирилл Евгеньевич (RU),
Субботина Марина Евгеньевна (RU),
Котнова Алина Петровна (RU),
Лаврова Наталья Витальевна (RU),
Семихин Александр Сергеевич (RU),
Соболева Любовь Александровна (RU),
Грунина Татьяна Михайловна (RU),
Овечкина Татьяна Андреевна (RU),
Бартов Михаил Сергеевич (RU),
Мишина Дарья Михайловна (RU),
Гинцбург Александр Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой
выступает Министерство промышленности и
торговли Российской Федерации
(Минпромторг России) (RU),
Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи"
Министерства здравоохранения и
социального развития Российской
Федерации (ФГБУ "НИИЭМ им. Н.Ф.
Гамалеи" Минздравсоцразвития России) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА В ВИДЕ КРОШКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к способу получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки. Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки, включающий измельчение кости, обработку фрагментов кости раствором Tween-80, удаление детергента, обработку смесью

изопропанол-хлороформ в ультразвуковой бане, далее крошку отмывают водой, обрабатывают раствором HCl, промывают дистиллированной водой, помещают в фосфатный буфер, отмывают дистиллированной водой, полученные фрагменты заливают этиловым спиртом, крошку высушивают, измельчают с помощью мельницы и фракционируют с помощью

виброгрохота на крошку определенного размера, лиофилизуют, стерилизуют при определенных условиях. Вышеописанный способ позволяет получить костный матрикс с

высокой биосовместимостью, остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами. 2 пр.

R U 2 4 5 6 0 0 3 C 1

R U 2 4 5 6 0 0 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 35/32 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011108938/15, 10.03.2011

(24) Effective date for property rights:
10.03.2011

Priority:

(22) Date of filing: 10.03.2011

(45) Date of publication: 20.07.2012 Bull. 20

Mail address:

123098, Moskva, ul. Gamalei, 18, FGBU "NIIeHM
im. N.F. Gamalei" Minzdravsotsrazvitija Rossii

(72) Inventor(s):

Lunin Vladimir Glebovich (RU),
Karjagina-Zhulina Anna Stanislavovna (RU),
Sharapova Natal'ja Evgen'evna (RU),
Ershova Anna Stepanovna (RU),
Gromov Aleksandr Viktorovich (RU),
Nikitin Kirill Evgen'evich (RU),
Subbotina Marina Evgen'evna (RU),
Kotnova Alina Petrovna (RU),
Lavrova Natal'ja Vital'evna (RU),
Semikhin Aleksandr Sergeevich (RU),
Soboleva Ljubov' Aleksandrovna (RU),
Grunina Tat'jana Mikhajlovna (RU),
Ovechkina Tat'jana Andreevna (RU),
Bartov Mikhail Sergeevich (RU),
Mishina Dar'ja Mikhajlovna (RU),
Gintsburg Aleksandr Leonidovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Rossijskaja Federatsija, ot imeni kotoroj
vystupaet Ministerstvo promyshlennosti i
torgovli Rossijskoj Federatsii (Minpromtorg
Rossii) (RU),
Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie "Nauchno-issledovatel'skij institut
ehpidemiologii i mikrobiologii imeni pochetnogo
akademika N.F. Gamalei" Ministerstva
zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitija
Rossijskoj Federatsii (FGBU "NIIeHM im. N.F.
Gamalei" Minzdravsotsrazvitija Rossii) (RU)

(54) METHOD OF PRODUCING DEMINERALISED CRUSHED BONE MATRIX

(57) Abstract:

FIELD: process engineering.

SUBSTANCE: invention relates to production of demineralised crushed bone matrix. Proposed method comprises bone crushing, bone fragments processing by Tween-80 solution, detergent removal and treatment by isopropanol-chloroform mix in ultrasound bath. Then, crumb is washed in water, processed by HCl solution, rinsed by distilled water

and placed into phosphate buffer to be rinsed by distilled water. Obtained fragments are filled with ethanol. Crumb is dried, minced by mill and sized on vibratory screen to preset size, freeze-dried and sterilised at definite conditions.

EFFECT: high biocompatibility, osteoconductive and osteoinductive properties.

2 e

Изобретение может применяться в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии при изготовлении лекарственных препаратов и изделий медицинского назначения для лечения заболеваний и повреждений костной системы человека в качестве активного биodeградируемого материала, биологического наполнителя при потере объема костной ткани, временного osteoconductive биологического опорного каркаса для регенерации костной ткани.

Деминерализованный костный матрикс является одним из наиболее распространенных материалов для костной пластики благодаря биосовместимости, хорошим osteoinductive и osteoconductive свойствам. Osteoinductive свойства обеспечиваются присутствием в деминерализованном костном матриксе нативных костных морфогенетических белков. Osteoconductive свойства достигаются за счет того, что collagen костной ткани обладает способностью к адгезии osteogenic клеток. Для достижения наилучшего клинического результата деминерализованный костный матрикс должен быть освобожден от минеральных компонентов и жиров, но при этом в нем необходимо сохранить активность нативных костных морфогенетических белков (Iwata H, Sakano S, Itoh T, Bauer TW. Demineralized bone matrix and native bone morphogenetic protein in orthopaedic surgery. // Clin Orthop Relat Res. 2002 Feb; (395): 99-109). Эти белковые факторы содержатся в кости в небольших количествах (по разным источникам от 2 до 180 мкг костных морфогенетических белков на 1 кг кости). Они очень консервативны и практически не отличаются по первичной структуре у человека и животных (Alaoui-Ismaili MH, Falb D. Design of second generation therapeutic recombinant bone morphogenetic proteins. // Cytokine Growth Factor Rev. 2009 Oct-Dec; 20(5-6): 501-507).

В зависимости от способа получения деминерализованный костный матрикс может обладать разными свойствами. Однако потеря костных морфогенетических белков значительно снижает osteoinductive свойства получаемого материала, степень деминерализации влияет на osteoconductive свойства материала, а содержание белков крови и липидов влияет на способность материала вызывать иммунный ответ. Влажность и стерильность продукта также влияют на время и условия его хранения.

Таким образом, применяемый в клинической практике деминерализованный костный матрикс должен иметь определенные стандартизуемые параметры. К таким параметрам относятся: размер частиц, уровень pH, содержание кальция и липидов, содержание нативных костных морфогенетических белков. Для различных клинических целей необходим деминерализованный костный матрикс с разной степенью деминерализации (содержание кальция 1-50 мг/г продукта) и размером частиц (от 0,5 до 2 мм). Для сохранения активности костных морфогенетических белков при хранении препарата его влажность не должна превышать 3-5%, а уровень pH должен лежать в диапазоне от 4,5 до 7,5, суммарное содержание костных морфогенетических белков BMP-2 и BMP-7 250-350 нг/г продукта. Для снижения риска иммунного ответа на введение материала, а также для максимального высвобождения белковых факторов роста кости уровень липидов не должен превышать 2%.

Существует несколько способов получения костной крошки. В патенте №2161976 способ включает очистку, измельчение костной ткани, гидролиз белков папаином и нейтрализацию получившегося материала. Недостатком этого способа является то, что обработка папаином может приводить к гидролизу факторов роста костной ткани и, следовательно, в полученных препаратах может отсутствовать osteoinductive свойства.

За прототип принят способ изготовления имплантатов из губчатой костной ткани, описанный в патенте №2172104, включающий измельчение кости, промывание водой, стерилизацию и консервацию, отличающийся тем, что костные фрагменты погружают в 6%-ный раствор перекиси водорода на 48 часов, затем погружают их в смесь этанола и хлороформа в соотношении 1:1, а костных фрагментов и смеси этанола с хлороформом в соотношении 1 объем костных фрагментов на 4 объема смеси сушат, после чего костные фрагменты замораживают при температуре -70°C в течение 24 часов, по истечении этого времени их подвергают лиофилизации, упаковывают и стерилизуют. Недостаток данного способа связан с тем, что в процессе длительной обработки перекисью водорода может происходить разрушение костных морфогенетических белковых факторов в получаемом материале. В результате получаемый материал может утратить остеоиндуктивные свойства.

Задачей настоящего изобретения является разработка способа получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки с определенными контролируруемыми параметрами.

Техническим результатом является получение деминерализованного костного матрикса в виде крошки со следующими свойствами: размер частиц от 0,5 до 2 мм, содержание кальция 1-50 мг/г продукта, влаги - не более 3%, липидов - не более 2%, рН 4,5-7,5, суммарное содержание костных морфогенетических белков BMP-2 и BMP-7 250-350 нг/г продукта. Благодаря этим свойствам данный материал может быть в дальнейшем использован, в частности, в качестве составной части композиционного материала, содержащего кроме костной крошки другие компоненты, такие как карбоксиметилцеллюлоза, гиалуроновая кислота, белки - факторы роста костной ткани и т.д.

Технический результат достигается за счет следующих особенностей разработанного способа получения костной крошки. Кость распиливают поперечно на фрагменты с толщиной 0,5-1 мм. Обработку фрагментов кости производят раствором детергента (Tween-80, 2%) в течение 12-24 часов, после чего детергент удаляют и повторяют обработку. Далее проводят обработку смесью изопропанол-хлороформ (1:1) в течение 24-48 часов в ультразвуковой бане с включением ультразвука в режиме 25 кГц на 15 минут 3 раза в сутки. После этого фрагменты отмывают водой 4 раза. Затем крошку обрабатывают раствором 0,6 М HCl в соотношении 10 частей кислоты к 1 части кости, в течение 30-90 минут. Для получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки с низким содержанием кальция (менее 2 мг/г крошки) применяется обработка 0,6 М HCl в течение 90 минут. Для получения крошки с более высоким содержанием кальция время экспозиции уменьшают. Крошку 3 раза промывают дистиллированной водой, помещают в фосфатный буфер (100 мМ, рН 7,0), в соотношении 2 части буфера на 1 часть крошки на 1 час, затем отмывают дистиллированной водой. Полученные фрагменты заливают этиловым спиртом на 1 час в соотношении 2 части спирта на 1 часть костных фрагментов. После этого крошку высушивают, измельчают с помощью мельницы, диаметр ячеек сита 3,0 мм и фракционируют с помощью виброгрохота на крошку размером 0,5-1 мм и 1-2 мм. Полученный деминерализованный костный матрикс в виде крошки лиофилизируют, после чего стерилизуют. Стерилизация производится радиационным способом. Значение поглощенной дозы 15 кГр.

Полученный материал контролируют на уровень рН, содержание кальция, липидов и уровень влажности, содержание белковых факторов роста кости (костных морфогенетических белков).

Длительная обработка детергентом позволяет избавиться от загрязнений органического происхождения.

Обработка смесью изопропанол-хлороформ позволяет удалить оставшийся жир из костного материала.

5 Обработка различными концентрациями соляной кислоты при разных временных экспозициях позволяет добиться необходимой степени деминерализации костного матрикса.

10 Обработка фосфатным буфером способствует восстановлению кислотности крошки.

Заключительная обработка этанолом производится для максимально возможного обезжиривания получившегося материала.

Лиофилизация материала необходима для сохранения активности нативных костных морфогенетических белков.

15 Сырьем для получения костной крошки может являться кость человека или позвоночных животных, птиц.

Основные преимущества изобретения

20 Обработка растворами детергентов на стадии депротеинизации, в отличие от более жесткой отмывки перекисью водорода, позволяет сохранять активность остеоиндуктивных факторов (костных морфогенетических белков) в получаемой крошке. Многократное обезжиривание с помощью смеси хлороформа и изопропанола в растворе детергента позволяет полностью удалить жировую фракцию. Кроме того, выбрана оптимальная продолжительность обработки соляной кислотой для

25 достижения требуемого уровня деминерализации костного матрикса, с одной стороны, и сохранения в нем белковых факторов роста кости - с другой, что также важно с точки зрения сохранения остеоиндуктивных свойств костного матрикса.

30 Использование фракционирования позволяет получить монодисперсные фракции, что предоставляет возможность создавать материалы различной структуры и свойств.

35 Таким образом, предлагаемый способ получения костной крошки позволяет получать материал, сохраняющий нативные костные морфогенетические белки, стандартизированный по размеру частиц, уровню pH, содержанию кальция и липидов (pH 4,5-7,5, остаточное содержание влаги - не более 3%, содержание кальция - 1-50 мг/г продукта (в зависимости от целей дальнейшего использования), липидов - не более 2%, суммарное содержание костных морфогенетических белков BMP-2 и BMP-7 250-350 нг/г продукта).

Описание примеров

40 Пример 1. Получение деминерализованного костного матрикса в виде крошки размером 1-2 мм с остаточным содержанием кальция 2 мг/г продукта

Бедренную кость распиливают на ленточной пиле C/E165 («La Minerva», Италия) поперек в области эпифиза до эпифизарной пластинки на пластины толщиной 0,5-1 мм. Полученные пластины (2 кг материала) помещают в 10 л 2% Tween-80 на 24 часа.

45 Процедуру повторяют два раза. Далее проводят обработку 6 л смеси изопропанол-хлороформ (1:1) в течение 24 часов в ультразвуковой ванне Transsonic TI-H-10 («Elma», Германия) с включением ультразвука в режиме 25 кГц на 15 минут 3 раза. После этого фрагменты отмывают водой 3 раза. Затем крошку обрабатывают 6 л раствора 0,6 М соляной кислоты в течение 90 минут с использованием вакуума. Крошку 3 раза

50 промывают дистиллированной водой, помещают в 2 л фосфатного буфера (100 мМ, pH 7,0) на 1 час, затем отмывают дистиллированной водой. Полученные фрагменты заливают 2 л этилового спирта на 1 час. После этого крошку измельчают на

мельнице IKA werke MF10 basic (IKA, Германия) и фракционируют на виброгрохоте ВП-30Т («Вибротехник», Россия), отбирая фракцию 1-2 мм. Полученный деминерализованный костный матрикс в виде крошки высушивают в течение суток в лиофильной сушке LABCONCO FreeZone Triad Freeze Dry System, модель 7400030 (5 «Lablonsco», США). Стерилизация производится радиационным способом на установке ГУ-200 (ФГУП «НИИП», Лыткарино). Значение поглощенной дозы 15 кГр.

Полученный материал контролируют на уровень рН, содержание кальция, липидов и уровень влажности, наличие костных морфогенетических белков.

10 Контроль эффективности деминерализации осуществляется за счет измерения содержания кальция в образцах деминерализованного костного коллагена при помощи колориметрического метода с крезолфталеинкомплексом по Faulker and Meites, 1982. Содержание кальция должно составлять 1-50 мг/г продукта в зависимости от целей дальнейшего использования.

15 Контроль влажности осуществляется на анализаторе влажности МВ45 («Ohaus», Швейцария) при 100°С в течение 10 мин. Уровень влажности не должен превышать 3%.

Определение остаточного содержания жира в образце костной крошки. В 20 фильтровый пакетик помещают 1-2 г образца. Массу образца (W_1) записывают.

Пакетик с образцом запаивают и просушивают в сушильном шкафу при 25 температуре 102°С±2 в течение 3 часов. По окончании сушки образцы немедленно помещают в эксикатор. Образцы охлаждают до комнатной температуры и взвешивают каждый пакетик сразу же после вынимания из эксикатора (W_2). Затем образцы помещают в камеру и добавляют 350 мл растворителя (петролейный эфир, 25 гексан или диэтиловый эфир). После экстракции в течение 40-60 минут образцы высушивают в сушильном шкафу при температуре 102°С±2 в течение 30 минут. По окончании сушки образцы помещают в эксикатор. Образцы охлаждают до комнатной температуры, снова взвешивают каждый пакетик поочередно сразу же после 30 вынимания из эксикатора (W_3).

Содержание жира в образцах рассчитывают по формуле:

$$\% \text{ Сырого жира} = \frac{100(W_2 - W_3)}{W_1},$$

35 где W_1 - начальная масса образца, W_2 - масса предварительно высушенного образца вместе с пакетиком, W_3 - масса высушенного образца вместе с пакетиком после экстракции.

Остаточное содержание жира в образце костной крошки не должно превышать 2%.

Определение рН образца костной крошки.

40 Определение рН осуществляется в соответствии с ГОСТ 52770-2007. Образец костной крошки массой 1 г помещают в пробирку вместимостью 12 мл и приливают 5 мл дистиллированной воды. Пробирку закрывают крышкой, встряхивают в течение 5 минут, оставляют на 1 час при комнатной температуре. Сливают отстоявшийся 45 раствор в чистую пробирку и определяют рН водной вытяжки с помощью рН-метра S20 SevenEasy («Mettler Toledo», Швейцария).

Значение рН водной вытяжки образца костной крошки должно находиться в пределах 4,5-7,5.

50 Определение содержания нативных костных морфогенетических белков ВМР-2 и ВМР-7 в полученном материале осуществляется следующим образом:

Смешивают 300 мг полученной костной крошки с 5 мл 4 М раствора гуанидин-хлорида и проводят экстракцию неколлагеновых белков в течение 24 часов при покачивании. Далее пробирку с образцом центрифугируют и отбирают

экстракт. Полученный экстракт диализуют последовательно против 300 мл раствора 4 М мочевины в течение ночи и дважды против 300 мл буфера Tris-HCl, 50 мМ рН 7,4. Далее в растворе после диализа определяют наличие BMP-2 и BMP-7 с помощью коммерчески доступных наборов ИФА BMP-7 DuoSet, BMP-2 DuoSet («R&D Systems», США).

Полученное значение должно лежать в пределах 100-200 нг/г крошки для BMP-2 и 100-150 нг/г крошки BMP-7.

Осуществление способа по примеру 1 позволило получить материал, сохраняющий нативные костные морфогенетические белки, стандартизированный по размеру частиц, уровню рН, содержанию кальция и липидов - рН 6,2, остаточное содержание влаги - 2%, содержание кальция - 1,8 мг/г продукта, липидов - 1,3%, суммарное содержание костных морфогенетических белков BMP-2 и BMP-7 270 нг/г продукта.

Пример 2

В экспериментальном исследовании применялась методика «Заполнение дефекта трубчатой кости костнопластическим материалом» (Берченко Г.Н., Кесян Г.А. Уразгильдеев Р.З. и др. Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование влияния некоторых используемых в травматолого-ортопедической практике кальций-фосфатных материалов на активацию репаративного остеогенеза. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН. - 2006. - №4. - С.327-332) в нашей модификации.

Животным, находящимся под эфирным наркозом, линейным разрезом широко открывали доступ к большеберцовой кости. Рассекали мышечный слой и надкостницу. На передней поверхности большеберцовой кости с помощью стерильного сверла бормашины производили пропил ближе к метафизарной зоне, в этом месте кость дает расширение и имеет более толстую стенку. В образовавшийся дефект вводили костнопластический материал. Рану наглухо ушивали.

Животных выводили из эксперимента на 60-е сутки, используя летальную дозу эфирного наркоза. Производили забор кости с вырезом области инокуляции костнопластического материала. Фрагменты кости фиксировали в 10%-ном растворе формалина, декальцинировали в 25%-ном растворе Трилона Б и заливали в парафин. Изготовленные срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Полученные гистологические препараты изучали при помощи аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (микроскоп AxioPlan plus фирмы Zeiss).

Деминерализованный костный матрикс в виде крошки размером 1-2 мм с остаточным содержанием кальция 2 мг/г продукта из примера 1 был использован для заполнения дефекта трубчатой кости 10 лабораторных животных (крыс). Показано, что материал не вызывает воспаления в зоне дефекта, кроме того, в зоне дефекта отмечается интенсивный рост костной ткани, что свидетельствует об остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойствах материала.

В ходе изучения зоны дефекта, заполненной деминерализованным костным матриксом в виде крошки, через 60 суток после операции было установлено, что под надкостницей располагается сеть кровеносных сосудов, придавая ей красно-коричневый оттенок.

В зоне дефекта повсеместно преобладает новообразованная ретикулофиброзная костная ткань, соединительнотканной прослойки вокруг костнопластического материала не выявлено. Признаков воспаления в области дефекта не выявлено. Материнская кость без признаков rarefакции с остеоцитами. Участки новообразованной костной ткани обильно снабжаются кровеносными сосудами,

которые заполнены кровью. Отмечается активная перестройка иррегулярной костной ткани с фиброзным матриксом в трабекулярную.

Наблюдаются активные процессы репаративного остеогенеза в области инокуляции в костную ткань деминерализованного костного матрикса в виде крошки.

5 Соединительнотканной прослойки, оплетающей костно-пластический материал, не выявлено. В материнской кости признаки rarefакции отсутствуют. Отмечается интенсивное образование костной ткани. Таким образом, данный материал обладает высокой биосовместимостью, остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами.

10

Формула изобретения

Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки, включающий измельчение кости, обработку фрагментов кости раствором детергента, удаление детергента, обработку смесью спирт-хлороформ (1:1), промывание водой, 15 лиофилизацию, стерилизацию, отличающийся тем, что кость распиливают поперечно на фрагменты толщиной 0,5-1 мм, проводят обработку фрагментов кости раствором Tween-80, 2%-ным, в течение 12-24 ч дважды, далее обрабатывают смесью изопропанол-хлороформ (1:1) в течение 24-48 ч в ультразвуковой бане, отмывают 20 водой, обрабатывают раствором 0,6 М HCl в соотношении 10 ч. кислоты к 1 ч. крошки в течение 30-90 мин, далее крошку промывают дистиллированной водой, помещают в фосфатный буфер в соотношении 2 ч. буфера на 1 ч. крошки, отмывают дистиллированной водой, полученные фрагменты заливают этиловым спиртом в соотношении 2 ч. спирта на 1 ч. костных фрагментов, крошку высушивают, 25 измельчают с помощью мельницы и фракционируют с помощью виброгрохота на крошку размером 0,5-1 мм и 1-2 мм.

30

35

40

45

50