



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 754**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05765896 .5**

96 Fecha de presentación : **27.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1896044**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2008**

54 Título: **Composición de formación osea compuesta de mezcla de osteoblasto y biomatriz y su procedimiento de fabricación.**

30 Prioridad: **13.06.2005 KR 20050050447**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2011

73 Titular/es: **Sewon Cellontech Co., Ltd.**
10, 11th., Goodmorning-Shinhan Tower
23-2, Yoido-dong
Youngdeungpo-gu, Seoul 150-712, KR

72 Inventor/es: **Jang, Jae-Deog;**
Park, Hyun-Shin;
Chang, Cheong-Ho;
Jung, Soo-Jin;
Lee, Sae-Bom y
Ko, Chang-Kwon

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 754 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de formación ósea compuesta de mezcla de osteoblasto y biomatriz y su procedimiento de fabricación

Campo Técnico

- 5 La presente invención se refiere a una composición para la formación ósea usando una mezcla de osteoblastos y biomatriz, y un procedimiento para la preparación de la misma. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición para la formación ósea usando una mezcla de osteoblastos y una biomatriz, que se puede trasplantar para la formación ósea después de tratar los defectos óseos o en una región que lo necesite, y un procedimiento para la preparación de la misma.

Técnica Anterior

- 10 Según los informes publicados por la Organización Mundial de La Salud (OMS), más de la mitad de las personas mayores de 65 años padecen enfermedades óseas crónicas, y se ha duplicado la incidencia de fractura ósea relacionada con la osteoporosis durante la pasada década. Estas cifras corresponden a aproximadamente el 40% de las mujeres de 50 años y mayores.
- 15 En los Estados Unidos, aproximadamente 5,60 millones de personas padecen fracturas óseas al año y 3,10 millones de ellas se someten a operaciones quirúrgicas. De acuerdo con un informe estadístico del Medical Data International (MDI) en 1995, se llevaron a cabo aproximadamente 426.000 casos de cirugías de injerto óseo. Se estima que los costes para el injerto óseo son de aproximadamente 800 millones de dólares estadounidenses al año en todo el mundo. Sólo durante el año 1995, se llevó a cabo injerto óseo incluyendo el 58% de autoinjerto, el 34% de aloinjerto y el 8% de trasplante de material sintético.
- 20 En general, se puede curar adecuadamente una fractura ósea simple (cerrada) escayolando la fractura ósea durante varias semanas, pero una fractura ósea grave o un defecto óseo requiere un injerto óseo.
- Sin embargo, tal autoinjerto puede provocar desfavorablemente un dolor fuerte en una región de recolección ósea y requerir un largo periodo de tiempo para la recuperación después de la operación quirúrgica de injerto óseo, y ha sufrido de muchas dificultades para obtener partes donantes para proporcionar hueso para el trasplante óseo.
- 25 Entretanto, el aloinjerto también sufre de desventajas fatales tales como el debilitamiento de la fuerza ósea durante un procedimiento de esterilización, la aparición de rechazo del implante y la posibilidad de transmisión de enfermedades contagiosas tales como la hepatitis y el SIDA.
- 30 Como otros procedimientos disponibles para el injerto óseo, los metales sobre los que se recubren los materiales cerámicos biológicamente activos o biológicamente no activos se usan ampliamente como materiales de apoyo en la cirugía ortopédica, pero existen muchas dificultades en el uso de metales para los trasplantes óseos debido a problemas tales como la corrosión de los metales, el desgaste de la superficie de metal-cerámica y la formación grave de tejidos fibrosos en las superficies de los huesos y trasplantes.
- 35 Para determinar los factores de formación ósea, aunque se han realizado muchos estudios sobre diversos factores después, Urist y Mclean (1952) han divulgado una publicación de los efectos de las proteínas de formación ósea sobre la formación de hueso, su procedimiento de producción es muy complejo y caro, y tiene una eficiencia baja, dando como resultado por lo tanto un rendimiento bajo y limitando finalmente su aplicación a un uso clínico práctico.
- 40 Entretanto, la inyección de médula ósea es una técnica basada en una aserción, propuesta por Huggins (1931), Frieden-stein (1973) y Ashton (1980), en la que las células osteoprogenitoras de la médula ósea inducen y facilitan la formación ósea. La inyección de médula ósea se lleva a cabo generalmente sólo para curar fracturas óseas, pero también se lleva a cabo en combinación con el injerto óseo. A diferencia de otras técnicas de injerto óseo, esta inyección de médula ósea no implica una incisión quirúrgica en la piel para obtener partes donantes y, por tanto, es significativamente ventajosa debido a que no hay problemas asociados con la obtención de partes donantes y no hay complicaciones o efectos secundarios adversos.
- 45 Posteriormente, incluso aunque se publican algunos resultados excelentes a través de muchos casos de aplicación clínica, la inyección de médula ósea es desfavorable debido a su fundamento teórico poco sólido, por el motivo de que una cantidad considerable de resultados obtenidos no es consistente entre sí, la cantidad de médula ósea que se puede recoger en un punto es limitada y además, existe un número significativamente limitado de células osteoprogenitoras contenidas en la médula ósea.
- 50 Como tal, un procedimiento de formación ósea y de trasplante novedoso mediante el cultivo y la amplificación de células osteoprogenitoras en una cantidad suficiente de células osteoblastos, la mezcla de las células cultivadas, con una biomatriz y la inyección de la mezcla resultante en una región de formación de hueso buscada es un procedimiento altamente eficaz, implica ventajas significativas y efectos beneficiosos, en comparación con el autoinjerto o aloinjerto y la inyección de médula ósea convencionales, y por tanto, es un campo de la ingeniería de tejidos que recibe mucha atención en las terapias de regeneración ósea.

Divulgación**Problema técnico**

5 Por lo tanto, se ha hecho la presente invención en vista de los problemas asociados con los implantes y las técnicas de injerto óseo convencionales tal como se discute anteriormente, y es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para la formación ósea usando una mezcla de osteoblastos y biomatriz, y un procedimiento para la preparación de la misma, dando como resultado ningún rechazo del injerto clínico por medio de inyección de mezcla de osteoblastos y biomatriz para la formación ósea en una zona en la que se busca la formación ósea, y que puede lograr la formación ósea eficaz y rápida por medio de la inyección de una composición que se formó hasta un cierto grado, de modo que alivie los problemas asociados con la probabilidad de la formación de tejido óseo en regiones no deseadas que resultan de la salida de osteoblastos inyectados desde la zona deseada para la formación ósea y luego la propagación de los mismos a otras zonas por medio del torrente circulatorio, lo que se puede provocar mediante la inyección de una suspensión de osteoblastos.

Solución técnica

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el anterior y otros objetos se pueden lograr mediante la provisión de un procedimiento para la preparación de una composición para la formación ósea, que comprende:

aislar los osteoblastos y sus células precursoras de un tejido óseo y cultivar/proliferar los osteoblastos aislados y sus células precursoras en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) o en α -MEM (Medio esencial mínimo, modificación alfa) para preparar una suspensión de osteoblastos; y

20 mezclar la suspensión de osteoblastos resultante con una biomatriz para preparar un agente terapéutico de osteoblastos.

En el presente documento, la etapa de preparación del agente terapéutico incluye además mezclar la solución mezclada de osteoblastos, en la que se mezcló la biomatriz en la suspensión de osteoblastos, con un coagulante.

25 En el presente documento, la etapa de mezcla incluye mezclar la solución mezclada de osteoblastos con de 10 a 100 UI/ml de trombina como coagulante; y mezclar la solución mezclada resultante que contiene trombina mezclada en ella con de 20 a 100 mg/ml de fibrinógeno como coagulante.

En el presente documento, la biomatriz es colágeno, hidroxiapatita o una mezcla de los mismos.

En el presente documento, se puede añadir colágeno en una cantidad de 67 μ g/ml a 20 mg/ml a la suspensión de osteoblastos, y se puede añadir hidroxiapatita en una cantidad de 30 μ g/ml a 3,4 mg/ml a la suspensión de osteoblastos.

30 El colágeno se neutraliza hasta un pH neutro mediante la adición de una solución de neutralización antes de mezclar con la suspensión de osteoblastos.

35 Antes de añadir a la solución mezclada de los osteoblastos y la biomatriz, se disuelve trombina liofilizada como trombina en DMEM o α -MEM líquido al que se añadieron iones fosfato (PO_4^{3-}) como componente mineral óseo, y se añade para que sea el doble de una cantidad de trombina contenida en el medio de cultivo en el que se añadieron los iones (PO_4^{3-}). Entonces, antes de añadir a la solución mezclada de osteoblastos resultante, se disuelve fibrinógeno liofilizado como fibrinógeno en DMEM o α -MEM líquido al que se añadieron iones de calcio (Ca^{2+}) como componente mineral óseo, y se añade para que sea el doble de una cantidad de fibrinógeno contenida en el medio de cultivo en el que se añadieron los iones de calcio (Ca^{2+}).

40 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para la formación ósea preparada mediante el procedimiento anterior para la preparación de una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz.

Efectos ventajosos

45 De acuerdo con una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, y un procedimiento para la preparación de la misma, que tiene una construcción como se describe anteriormente, es posible lograr la formación ósea, dando como resultado ningún rechazo de injerto clínico por medio de la inyección de una mezcla de osteoblasto y biomatriz para la formación ósea en una zona en la que se busca la formación ósea, y que puede lograr la formación ósea eficaz y rápida por medio de la inyección de una composición que se formó hasta un cierto grado, de modo que alivie los problemas asociados con la probabilidad de formación de tejido óseo en regiones no deseadas que resultan de la salida de osteoblastos inyectados desde la zona deseada para la formación de huesos y luego la propagación de los mismos a otras zonas por medio del torrente circulatorio, lo que se puede provocar mediante la inyección de una suspensión de osteoblastos.

Descripción de los dibujos

El anterior y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se comprenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

La fig. 1 es una gráfica de barras que muestra una proporción de la composición del hueso;

5 La fig. 2 es una gráfica de flujo de procedimiento que ilustra un procedimiento para la preparación de una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz de acuerdo con la presente invención;

La fig. 3 es una fotografía que ilustra la inyección subcutánea de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un ratón inmunodeficiente;

10 La fig. 4 es una fotografía de un ratón inmunodeficiente tomada 4 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz;

La fig. 5 es una fotografía de un trasplante tomada 4 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un ratón inmunodeficiente;

15 La fig. 6 es una autorradiografía de un ratón inmunodeficiente tomada 4 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz;

La fig. 7 es una fotografía de una sección de tejido teñida con hematoxilina-eosina que puede confirmar la formación ósea, tomada 8 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un ratón inmunodeficiente; y

20 La fig. 8 es una fotografía de una sección de tejido teñida con tricrómico de Masson, tomada 8 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un ratón inmunodeficiente.

Mejor modo

25 A continuación en el presente documento, se describirá con más detalle un procedimiento para la preparación de una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, de acuerdo con la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos.

30 Con el fin de superar las desventajas mostradas por las terapias convencionales para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con el hueso, tales como implantes e injerto óseo, se ha desarrollado una técnica de trasplante de osteoblastos autólogos que no tienen efectos secundarios adversos sobre una parte afectada, por medio del cultivo de osteoblastos, como un procedimiento de tratamiento último, en conjunción con una mejora en las terapias convencionales.

Sin embargo, para lograr una formación ósea más rápida, es necesario mezclar los osteoblastos con una matriz a través de la que se pueden tratar lesiones más diversas, y por tanto, es posible tratar más enfermedades óseas que no lograr beneficios terapéuticos mediante la inyección de una suspensión de osteoblastos líquida que consiste sólo en osteoblastos.

35 Se puede decir que el agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, es una versión más avanzada de un procedimiento de inyección de una suspensión de osteoblastos líquida que está basada en terapia celular. El procedimiento de inyección convencional de una suspensión de osteoblastos líquida, que implica el trasplante sólo de osteoblastos, sólo puede tratar tipos limitados de defectos óseos y también sufre de problemas asociados con la probabilidad de la formación de tejido óseo en regiones no deseadas que resultan de la salida de osteoblastos inyectados desde las zonas de formación ósea deseadas y luego la propagación de los mismos a otras zonas por medio del torrente circulatorio. En cambio, el agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, de acuerdo con la presente invención, está constituida por la mezcla de osteoblastos y biomatriz y por lo tanto, también se puede tratar más rápida y eficazmente un intervalo más amplio de defectos óseos y enfermedades óseas graves.

40 Los huesos están compuestos de células óseas y grandes cantidades de matrices óseas presentes entre las células. La mayoría de las partes de las matrices óseas están comprendidas de componentes orgánicos (35%) constituidos por fibras de colágeno y componentes inorgánicos (65%) constituidos por calcio y fosfato.

45 Los huesos, como se muestra en la fig. 1, son sustancias biosintéticas y están compuestas de minerales, colágeno, humedad, proteínas no colágenas, lípidos, componentes vasculares y células, en orden de la proporción de composición más alta a la más baja.

50 El material inorgánico que toma las porciones más grandes de composición ósea es un análogo de hidroxiapatita (HA) que es un mineral geológico.

La apatita ósea generalmente es deficiente de grupos de calcio e hidroxilo, que están reemplazados por multitud de impurezas incluyendo carbonato y otras magnesio, potasio, boro, fosfato y citrato, de los que el más abundante es carbonato.

5 Un contenido de carbonato en los minerales óseos aumenta con la maduración de los huesos. El carbonato reemplaza grupos hidroxilo o fosfato, o se puede adsorber sobre la superficie de la apatita ósea.

El segundo constituyente más abundante de los huesos es colágeno, principalmente colágeno de tipo I. El colágeno imparte elasticidad y flexibilidad a los huesos y ofrece una dirección para la constitución de la matriz.

10 De acuerdo con la realización de la presente invención, los osteoblastos se mezclan con la biomatriz y la mezcla resultante se debe inyectar en las regiones que padecen enfermedades óseas, y el colágeno y la hidroxiapatita, que son componentes óseos, se mezclan y se inyectan en las lesiones. Por lo tanto, es posible obtener propiedades físicas de los huesos con antelación y con ello realizar una formación ósea más rápida y huesos adecuadamente mineralizados.

15 Al mezclar los osteoblastos, un componente principal de la matriz ósea, con la biomatriz, uno de los factores más cruciales es la estabilidad. Con el fin de obtener cantidades suficientes de las células, dentro de la matriz, se debe potenciar la tasa de supervivencia de las células. Además, también es importante incrementar la tasa de injerto de las células, después de realizar el trasplante de las mismas.

La fig. 2 es una gráfica de flujo de procedimiento que ilustra un procedimiento para la preparación de una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz de acuerdo con la presente invención.

20 En referencia a la fig. 2, el procedimiento para la preparación de una composición para la formación ósea de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de aislar los osteoblastos de un tejido óseo y cultivar/proliferar los osteoblastos aislados en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) o α -MEM (Medio esencial mínimo, modificación alfa) para preparar una suspensión de osteoblastos (S100); y mezclar la suspensión de osteoblastos resultante con una biomatriz para preparar un agente terapéutico de osteoblastos (S200).

25 En el presente documento, el número de osteoblastos en la suspensión de osteoblastos puede variar significativamente dependiendo del tamaño y de la localización de las lesiones de interés. Normalmente, el número de osteoblastos está preferentemente en un intervalo de 10^6 a $1,2 \times 10^7$ células, aunque se puede usar un número mayor de células.

30 En el presente documento, la etapa de preparación (S200) del agente terapéutico incluye además mezclar la solución mezclada de osteoblasto/biomatriz, en la que la biomatriz se mezcló en la suspensión de osteoblastos, con un coagulante.

En el presente documento, la etapa de mezclado incluye mezclar la solución mezclada de osteoblasto/biomatriz con de 10 a 100 UI/ml de trombina como coagulante (S220), y mezclar la solución mezclada resultante que contiene trombina mezclada en la misma con de 20 a 100 mg/ml de fibrinógeno como coagulante (S230).

35 Como biomatriz, se puede usar colágeno, hidroxiapatita o una mezcla de ambas. Cuando se usa la mezcla de colágeno e hidroxiapatita como biomatriz, se mezclan de 67 μ g/ml a 20 mg/ml de colágeno con de 30 μ g/ml a 3,4 mg/ml de hidroxiapatita.

40 Entretanto, una concentración mínima de colágeno fue una concentración de cultivo óptima que induce la diferenciación y proliferación celular cuando se usó colágeno como material de revestimiento para revestir un vaso de cultivo en el cultivo de osteoblastos. Cuando se aplicó la concentración de colágeno aplicada en este momento como el componente de matriz, se pudo confirmar que al inyectar la composición en la que se mezclaron los osteoblastos y la biomatriz entre sí, los componentes de colágeno, que se inyectaron antes de que los osteoblastos expresaran colágeno, forman una red de matriz básica, dando como resultado la diferenciación celular y la mineralización rápida, lo que conduce como consecuencia a una formación ósea rápida con una cantidad mínima de colágeno. Entretanto, donde se usó colágeno como una matriz aislada, la concentración de colágeno igual o superior a 3 mg/ml (0,3%) conduce a gelación bajo condiciones predeterminadas, formando de este modo una matriz. En cambio, una concentración máxima de 20 mg/ml de colágeno da como resultado una disminución brusca de la fluidez de la misma y, por tanto, los osteoblastos no se dispersan homogéneamente en la matriz de colágeno y, por tanto, resulta difícil aplicar el colágeno como una matriz celular.

50 Adicionalmente, se debe añadir hidroxiapatita en una concentración tal que la hidroxiapatita promueva la mineralización en una mezcla de matriz. Donde se contiene una cantidad en exceso de hidroxiapatita, ésta puede inhibir la diferenciación celular debido a la restricción espacial que se produce debido a la ocupación de hidroxiapatita en la mezcla de matriz celular. Por lo tanto, en la presente invención, se aplica hidroxiapatita en una concentración mínima a la cual la hidroxiapatita puede servir como un núcleo para la mineralización en el componente de matriz, y en una concentración óptima para promover la mineralización.

Por otra parte, el colágeno se neutraliza hasta un pH neutro mediante la adición de una solución de neutralización antes de mezclar con la suspensión de osteoblastos.

Además, antes de añadir a la solución mezclada de los osteoblastos y la biomatriz, se disuelve trombina liofilizada como trombina en DMEM o α -MEM líquido al que se añadieron iones fosfato (PO_4^{3-}), y se añade para que sea el doble de una cantidad de trombina contenida en el medio de cultivo en el que se añadieron iones (PO_4^{3-}). Entonces, antes de añadir a la solución mezclada de osteoblastos resultante, se disuelve fibrinógeno liofilizado como fibrinógeno en DMEM o α -MEM líquido al que se añadieron iones de calcio (Ca^{2+}), y se añade para que sea el doble de una cantidad de fibrinógeno contenida en el medio de cultivo en el que se añadieron los iones de calcio (Ca^{2+}). En el presente documento, los iones fosfato y los iones de calcio no muestran efectos citotóxicos sobre los osteoblastos y complementan los componentes minerales óseos.

La trombina como coagulante se mezcla en una cantidad de 10 a 100 UI/ml en la solución mezclada, y el fibrinógeno como coagulante se mezcla en una cantidad de 20 a 100 mg/ml en la mezcla resultante que contiene trombina mezclada en la misma.

Entretanto, una concentración de trombina determina un tiempo de polimerización de fibrina. Por lo tanto, el tiempo de polimerización de fibrina se puede reducir dentro de un intervalo de 4 horas a 3 segundos, dependiendo de la concentración de trombina. Se aplica trombina a la concentración de modo que la composición de la presente invención se forma para prevenir que una composición mezclada de osteoblastos y biomatriz se filtre de las zonas de lesión de interés cuando se inyecta en una zona para la formación ósea, la inyección de la composición en la zona afectada conduce a una rápida polimerización, y se forma una matriz porosa de fibrina óptima para la formación ósea mediante osteoblastos.

Modo para la invención

Ejemplos

A continuación en el presente documento, se describirán con más detalle los efectos de una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz de acuerdo con un ejemplo de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos.

Ejemplo 1

En primer lugar, se aislaron los osteoblastos y sus células precursoras de los tejidos correspondientes, y se cultivaron y proliferaron en DMEM o α -MEM durante 4 semanas, preparando de este modo una suspensión de osteoblastos compuesta de DMEM o α -MEM. Se preparó colágeno como una biomatriz para mezclarse en la misma.

Después, se mezcló la suspensión de osteoblastos resultante con colágeno, para preparar de este modo un total de 1 ml de una composición para la formación ósea.

Ejemplo 2

Se aislaron los osteoblastos y sus células precursoras de los tejidos correspondientes, y se cultivaron y proliferaron en DMEM o α -MEM durante 4 semanas, preparando de este modo una suspensión de osteoblastos compuesta de DMEM o α -MEM. Se prepararon colágeno e hidroxiapatita como biomatrices. Se añadió 1/10 de volumen de hidroxiapatita a la suspensión de osteoblastos y se mezcló bien. Se prepararon 2/5 de volumen de colágeno como biomatriz para mezclarse en la misma.

Se mezcló la suspensión de osteoblastos con colágeno para preparar un total de 1 ml de una composición para la formación ósea.

Ejemplo 3

Se aislaron los osteoblastos y sus células precursoras de los tejidos correspondientes, y se cultivaron y proliferaron en DMEM o α -MEM durante 4 semanas, preparando de este modo una suspensión de osteoblastos compuesta de DMEM o α -MEM. Se prepararon colágeno e hidroxiapatita como biomatrices. Se añadieron 2/5 de volumen de colágeno y un 1/10 de volumen de hidroxiapatita a la suspensión de osteoblastos y se mezcló bien, formando de este modo un agente terapéutico de osteoblastos mezclado con biomatrices.

Después de preparar un adhesivo de fibrina de grado médico fijado a temperatura ambiente, se disolvió el fibrinógeno añadiendo una cantidad apropiada de DMEM o α -MEM líquido a un vial que contenía fibrinógeno liofilizado. Además, también se disolvió trombina añadiendo una cantidad apropiada de DMEM o α -MEM líquido a un vial que contenía la trombina liofilizada.

Entonces, se añadió 1/10 de volumen de la trombina disuelta a la suspensión de osteoblastos líquida en la que se mezclaron las biomatrices, y se mezcló bien la mezcla resultante.

Se mezcló la suspensión de osteoblastos mezclada con trombina y biomatrices con una cantidad igual de fibrinógeno disuelto para preparar un total de 1 ml de una composición para la formación ósea.

Ejemplo 4

5 Se aislaron los osteoblastos y sus células precursoras de los tejidos correspondientes, y se cultivaron y proliferaron en DMEM o α -MEM durante 4 semanas, preparando de este modo una suspensión de osteoblastos compuesta de DMEM o α -MEM. Se prepararon colágeno e hidroxiapatita como biomatrices. Se añadieron 2/5 de volumen de colágeno y un 1/10 de volumen de hidroxiapatita a la suspensión de osteoblastos y se mezcló bien, formando de este modo un agente terapéutico de osteoblastos mezclado con las biomatrices.

10 Después de preparar un adhesivo de fibrina de grado médico fijado a temperatura ambiente, se disolvió el fibrinógeno añadiendo una cantidad apropiada de DMEM o α -MEM líquido a un vial que contenía fibrinógeno liofilizado. Además, también se disolvió trombina añadiendo una cantidad apropiada de DMEM o α -MEM líquido a un vial que contenía la trombina liofilizada.

15 En este momento, se usó DMEM o α -MEM líquido en el que se añadieron iones fosfato (PO_4^{3-}) a una concentración de 2 mg/ml. Además, se añadió una cantidad apropiada de DMEM o α -MEM líquido a un vial que contenía la trombina liofilizada, disolviendo de este modo la trombina. En este momento, se usó el DMEM o α -MEM líquido en el que se añadieron iones de calcio (Ca^{2+}) a una concentración de 4 mg/ml. Las cantidades de iones fosfato (PO_4^{3-}) y de iones de calcio (Ca^{2+}) usadas en el presente documento son cantidades óptimas que no muestran efectos citotóxicos sobre los osteoblastos y que sirven como aditivos para la solución de cultivo para complementar de este modo los componentes minerales óseos.

20 Después, se añadió la trombina disuelta en 1/10 de volumen a la suspensión de osteoblastos líquida mezclada con biomatrices y se mezcló bien.

Se mezcló la suspensión de osteoblastos que contenía trombina y biomatrices mezcladas en ella con una cantidad igual de fibrinógeno disuelto para preparar un total de 1 ml de una composición para la formación ósea.

Resultados

25 Se dividieron 15 ratones inmunodeficientes en 6 grupos (ensayo triple). Después, se preparó un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, y se inyectó en la escápula de los ratones atímicos por medio de inyección subcutánea. Se inyectó 1 ml del agente terapéutico de osteoblastos en la hipodermis de cada ratón inmunodeficiente. Se confirmaron los resultados 4 semanas y 8 semanas después de la inyección.

Tabla 1

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Número de células (células)	1×10^6 células	6×10^6 células	$1,2 \times 10^7$ células
Volumen de inyección (cc)	1 ml	1 ml	1 ml

30 La tabla 1 muestra los agentes terapéuticos de osteoblastos respectivos que tienen la misma composición de biomatriz pero distinto número de osteoblastos, que son mezclas de osteoblastos y biomatrices, trasplantadas en ratones inmunodeficientes.

Tabla 2

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Volumen de tamaño (cc)	0,26	0,24	0,25
Formación ósea	Buena	Buena	Buena

En el presente documento, el grado de formación ósea se clasifica en orden de excelente/bueno/suficiente/pobre.

35 8 semanas después del trasplante de los agentes terapéuticos de osteoblastos, como se dan en la tabla 1, se muestran los resultados para la formación ósea así obtenida en la tabla 2.

Tabla 3

	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Número de células (células)	6×10^5 células	6×10^6 células	6×10^6 células
Vol. de colágeno	1/5	2/5	1
Volumen de inyección (cc)	1 ml	1 ml	1 ml

La tabla 3 muestra los agentes terapéuticos de osteoblastos respectivos que tienen cantidades diferentes de biomatrices añadida, que son mezclas de osteoblastos y biomatrices, trasplantadas en ratones inmunodeficientes.

Tabla 4

	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Volumen de tamaño (cc)	0,24	0,52	0,50
Formación ósea	Buena	Excelente	Excelente

En el presente documento, el grado de formación ósea se clasifica en orden de excelente/bueno/suficiente/pobre.

5 8 semanas después del trasplante de los agentes terapéuticos de osteoblastos, como se dan en la tabla 3, se muestran los resultados para la formación ósea así obtenida en la tabla 4.

La fig. 3 es una fotografía que ilustra la inyección subcutánea de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un ratón inmunodeficiente. La fig. 4 es una fotografía de formación ósea (observada como una porción abultada circunscrita por una línea discontinua) en un ratón inmunodeficiente tomada 4
10 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz.

La fig. 5 es una fotografía de un trasplante de formación ósea tomada 4 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un ratón inmunodeficiente, confirmando así que se indujo la formación de vasos sanguíneos alrededor del trasplante. La fig. 6
15 es una autorradiografía de un ratón inmunodeficiente tomada 4 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz y se observó que se formó un nuevo hueso sobre la estructura, como circunscrito por un círculo de línea discontinua.

La fig. 7 es una fotografía de una sección de tejido teñida con hematoxilina-eosina que puede confirmar la formación ósea, tomada 8 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un ratón inmunodeficiente. Como se puede ver, se observa un osteoide
20 (representado por una flecha de bloque) y también se pueden confirmar osteoblastos distribuidos dentro de una laguna (representada por una flecha blanca).

La fig. 8 es una fotografía de una sección de tejido teñida con tricrómico de Masson, tomada 8 semanas después de un trasplante de un agente terapéutico de osteoblastos, que es una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, en un
25 ratón inmunodeficiente, y se puede confirmar que se produjo formación ósea junto con colágeno con el modelo predeterminado, mostrando así la penetración de vasos sanguíneos entre las matrices.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento de formación ósea, que da como resultado ningún rechazo de injerto clínico por medio de la inyección de una mezcla de osteoblasto y biomatriz en una zona en la que se busca la formación ósea, y que puede lograr la formación ósea eficaz y rápida por medio de
30 la inyección de una composición que se formó hasta un cierto grado.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, y un procedimiento para la preparación de la misma, que tiene una construcción como se describe anteriormente, permite la realización de formación ósea, dando como resultado ningún rechazo de
35 injerto clínico por medio de la inyección de una mezcla de osteoblasto y biomatriz para la formación ósea en una zona en la que se busca la formación ósea, y que puede lograr la formación ósea eficaz y rápida por medio de la inyección de una composición que se formó hasta un cierto grado, de modo que alivie los problemas asociados con la probabilidad de formación de tejido óseo en regiones no deseadas que resultan de la salida de osteoblastos inyectados desde la zona marcada para la formación de huesos y luego la propagación de los mismos a otras zonas por medio del
40 torrente circulatorio, lo que se puede provocar mediante la inyección de una suspensión de osteoblastos.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han dado a conocer para fines ilustrativos, los expertos en la técnica apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la formación ósea preparada mediante el procedimiento para la preparación de una composición para la formación ósea usando una mezcla de un osteoblasto y una biomatriz, que comprende:
- 5 cultivar/proliferar osteoblastos aislados y sus células precursoras en alfa-MEM (Medio esencial mínimo, de un tejido óseo, modificación alfa) para preparar una suspensión de osteoblastos; y
- mezclar la suspensión de osteoblastos resultante con una biomatriz para preparar un agente terapéutico de osteoblastos,
- 10 en la que la biomatriz es una mezcla de colágeno e hidroxiapatita,
- en la que se añade colágeno en una cantidad de 67 µg/ml a 20 mg/ml a la suspensión de osteoblastos, y se añade hidroxiapatita en una cantidad de 30 µg/ml a 3,4 mg/ml a la suspensión de osteoblastos.
2. La composición para la formación ósea de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la etapa de preparación del agente terapéutico incluye además mezclar la solución mezclada de osteoblastos, en la que se mezcló la biomatriz en la suspensión de osteoblastos, con un coagulante.
3. La composición para la formación ósea de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la etapa de mezcla incluye:
- 15 mezclar la solución mezclada de osteoblastos con de 10 a 100 UI/ml de trombina como el coagulante; y
- mezclar la solución mezclada resultante que contiene trombina mezclada en ella con de 20 a 100 mg/ml de fibrinógeno como el coagulante.
4. La composición para la formación ósea de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el colágeno se neutraliza hasta un pH neutro mediante la adición de una solución de neutralización antes de mezclar con la suspensión de osteoblastos.
- 20
5. La composición para la formación ósea de acuerdo con la reivindicación 3, en la que
- 25 antes de añadir a la mezcla del osteoblasto y la biomatriz, se disuelve trombina liofilizada como trombina en alfa-MEM líquido al que se añadieron iones fosfato (PO_4^{3-}) como componente mineral óseo, y se añade para que sea el doble de una cantidad de trombina contenida en el medio de cultivo en el que se añadieron iones fosfato (PO_4^{3-}); y
- antes de añadir a la solución mezclada de osteoblastos resultante, se disuelve fibrinógeno liofilizado como fibrinógeno en alfa-MEM líquido al que se añadieron iones de calcio (Ca^{2+}) como componente mineral óseo, y se añade para que sea el doble de una cantidad de fibrinógeno contenida en el medio de cultivo en el que se añadieron iones de calcio (Ca^{2+}).
- 30

Fig. 1

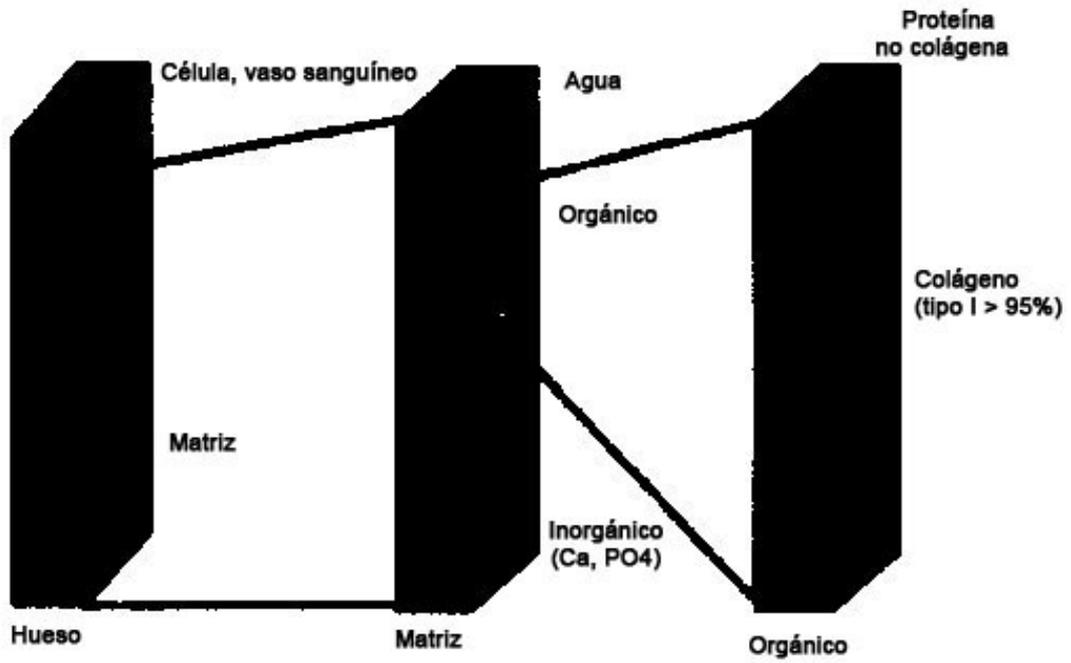


Fig. 2

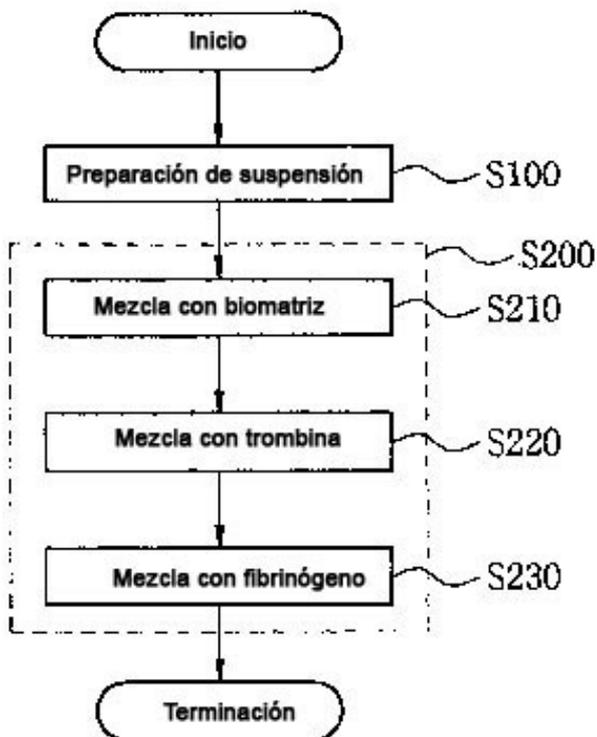


Fig. 3

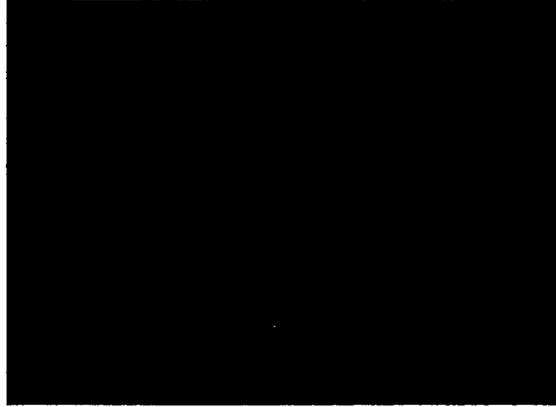


Fig. 4

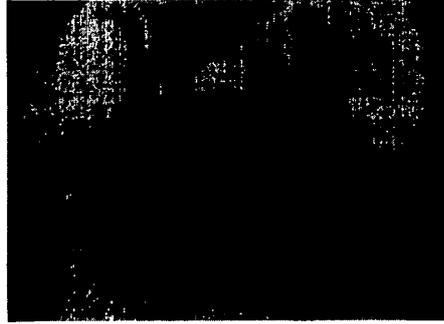


Fig. 5



Fig. 6

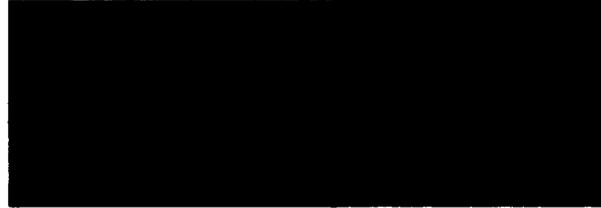


Fig. 7

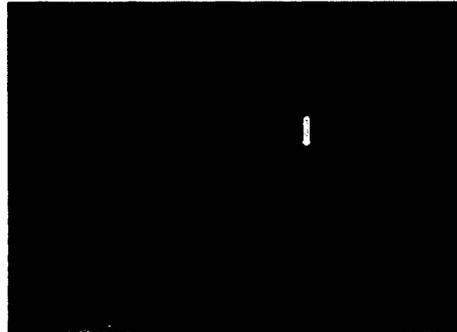


Fig. 8

