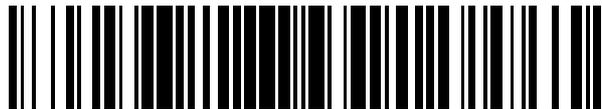


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 951**

51 Int. Cl.:
C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07808564 .4**
- 96 Fecha de presentación: **31.08.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2064317**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54 Título: **Aislamiento de células**

30 Prioridad:
31.08.2006 EP 06076645

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.04.2012

73 Titular/es:
**CELLCOTEC B.V.
PROF. BRONKHORSTLAAN 10 D
3723 MB BILTHOVEN, NL**

72 Inventor/es:
HENDRIKS, Jeanine Anna Alphonse

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 377 951 T3

DESCRIPCIÓN

Aislamiento de células

La invención se refiere a un método para aislar células de una muestra de tejido.

5 Los trastornos cartilagosos son trastornos altamente debilitantes que incluyen, por ejemplo, traumatismo cartilaginoso articular, lesión de menisco, trastornos condrogenéticos y artritis. No existen actualmente terapias óptimas disponibles para tratar estos trastornos. El tejido cartilaginoso no está innervado ni penetrado por los sistemas vascular ni linfático, y se cree generalmente que, debido a esta falta de vasos, el tejido cartilaginoso dañado no recibe estímulos suficientes o apropiados para desencadenar una respuesta de reparación. La reparación de articulaciones artríticas requiere por tanto cirugía ortopédica para reemplazar las articulaciones desgastadas por una prótesis o por un injerto biológico. Particularmente, la artritis es un problema médico y económico enorme.

10 Los enfoques actuales para reparación de cartílago se basan en la retirada de los restos de tejido, el acceso al sistema de curación de heridas del hueso penetrando la placa ósea subcondrial y el trasplante de tejido y terapias basadas en células. Las terapias clínicas actuales implican típicamente células autólogas. Son ejemplos de dichas terapias la implantación de condrocitos autólogos (ICA) y la mosaicoplastia (también conocida como injerto osteocondral autólogo). Debido a sus grandes inconvenientes, ambas terapias pueden dirigirse solo a una parte limitada del mercado de reparación de cartílago

15 Para la mosaicoplastia, la desventaja principal es la limitación a defectos pequeños debido a la disponibilidad limitada de tejido de donante para trasplante. Para la ICA, los inconvenientes incluyen la necesidad de efectuar dos operaciones quirúrgicas, una para recoger tejido cartilaginoso, y otra para la implantación de los condrocitos propagados *in vitro* obtenidos del tejido cartilaginoso recogido. Aparte del hecho de estar implicados costes altos, el proceso de ICA es largo, puesto que es necesaria la propagación celular *in vitro* durante la cual las células cartilaginosas se desdiferencian y pierden su fenotipo. Por ello, es necesaria una larga rehabilitación de varios meses después del procedimiento de implantación quirúrgica para que las células recuperen su fenotipo original. Solo entonces puede empezar la verdadera reparación de cartílago.

20 Recientemente, se ha desarrollado una ICA de segunda generación que implica condrocitos autólogos en una matriz de biomaterial. Esta técnica resuelve algunos de los problemas de la ICA, particularmente el procedimiento quirúrgico largo y abierto que era necesario en ICA. Sin embargo, permanecen inconvenientes importantes: tienen que llevarse a cabo procedimientos quirúrgicos que implican altos costes y una larga rehabilitación. Una de las razones por las que tienen que llevarse a cabo dos procedimientos quirúrgicos es que los procesos actuales para aislar condrocitos de una muestra de tejido extraída del paciente llevan mucho tiempo.

25 El cartílago hialino, la forma más abundante de cartílago, es de suavidad cristalina, brillante y de apariencia blanca azulada, y de esta forma de cartílago, el cartílago articular es el más común. El cartílago articular cubre los extremos de los huesos largos de las articulaciones sinoviales. Se caracteriza por una organización estructural particular, consistente en condrocitos embebidos en un material extracelular, designado típicamente como "matriz cartilaginosa", que es una matriz extracelular rica en proteoglicanos, fibrillas de colágeno, otras proteínas y agua. Los condrocitos son el único tipo celular encontrado en cartílago articular normal, pero contribuyen con menos de un 2% al peso húmedo del tejido cartilaginoso adulto sano humano.

30 La matriz extracelular del tejido cartilaginoso consiste predominantemente en moléculas de proteoglicano específicas de cartílago con cadenas laterales de glucosaminoglicano (GAG) sulfatadas altamente cargadas negativamente, así como fibrillas de colágeno de tipo II. Las cadenas laterales de GAG pueden unirse a moléculas de agua, secuestrando así el agua y generando una presión de hinchamiento interna dentro de la matriz cartilaginosa. Estas propiedades de tipo hidrogel son esenciales para los patrones de flujo del fluido intersticial observados dentro de la matriz durante la carga funcional del cartílago, en cuyo punto se expulsa el agua del tejido en una cantidad que permite a las cadenas de GAG cargadas negativamente repelerse entre sí. Tras la liberación de la carga compresiva, se vuelve a embeber agua en la matriz de tejido. La red colagenosa, junto con los GAG unidos por agua, posibilita al cartílago articular soportar grandes cargas compresivas, lo que da al tejido su función única en articulaciones sinoviales: una articulación suave e indolora, una distribución de la carga aplicada sobre el hueso subcondrial y la absorción de los choques mecánicos.

35 En tejido cartilaginoso normal, los proteoglicanos se recambian lenta pero continuamente, las moléculas degradadas se liberan del cartílago y se reemplazan por componentes recién sintetizados. Es el control coordinado de la síntesis y degradación de los componentes de la matriz por los condrocitos lo que mantiene el cartílago normal.

40 Después de extraer una muestra de tejido del cartílago del paciente, los condrocitos presentes en esa muestra tienen que aislarse de la matriz extracelular antes de que puedan propagarse e implantarse con el objetivo de reparar un defecto de tejido cartilaginoso. La liberación enzimática de las células localizadas en la matriz extracelular requiere la difusión de la enzima al sustrato (por ejemplo, colágeno), la digestión del colágeno y la liberación de las células.

Los procedimientos conocidos para el aislamiento de condrocitos se llevan a cabo incubando una muestra de tejido cartilaginoso con una disolución de colagenasa durante un periodo de 16 a 22 horas. La creencia actual es que tiempos de incubación más cortos no producen suficientes rendimientos celulares con fines de propagación y reparación de tejido, mientras que se cree que una exposición más larga a colagenasa compromete la viabilidad celular. El tiempo de incubación más corto descrito en la materia parece ser de 2 horas (Jakob *et al.*, Connective Tissue Research, 44 (2003), 173-180). La digestión nunca terminaba antes de 2 horas.

La presente invención proporciona un método para aislar condrocitos de una muestra de tejido cartilaginoso que es considerablemente más corto que los métodos de la técnica anterior. Por tanto, al contrario que los procedimientos de aislamiento conocidos, puede completarse un método para aislar condrocitos según la invención en la duración habitual de un procedimiento quirúrgico para reparar un defecto cartilaginoso. Los procedimientos quirúrgicos para tratamientos de defectos cartilaginosos duran habitualmente entre 30 y 90 minutos. Sorprendentemente, se ha mostrado ahora que puede aislarse un número sustancial y suficiente de células al cabo de 30 minutos o incluso 10 minutos.

La opinión actual en la materia es que se requiere un alto número de condrocitos para uso en la reparación de defectos cartilaginosos: típicamente al menos 1 millón de condrocitos para la reparación de un defecto que tenga un volumen de 1 ml. Sorprendentemente, se ha mostrado ahora que números de células menores de 1 millón de condrocitos pueden ser suficientes para aplicar a un defecto de tejido cartilaginoso de un volumen de 1 ml y conseguir la formación de cartílago.

La presente invención se refiere por tanto a un método para aislar condrocitos de una muestra de tejido cartilaginoso como se define en la reivindicación 1.

En una realización preferida, los condrocitos se aíslan de una muestra de cartílago articular, por ejemplo, para la reparación de defectos cartilaginosos.

Antes de someter la muestra de tejido a la enzima de digestión, un método según la invención puede comprender triturar la muestra de tejido para obtener fragmentos menores del tejido, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 2 mm de diámetro, más preferiblemente de aproximadamente 1 mm. La trituración puede efectuarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo usando tijeras, una o más cuchillas (puede usarse un conjunto de cuchillas paralelas para hacer cortes, o pueden usarse dos de dichos conjuntos para hacer cubos), un escalpelo, filtrando a través de una criba o tamiz de malla de acero o nailon, o disgregando a través de una aguja.

En una realización preferida, se somete la muestra de tejido a un tratamiento para aumentar la permeabilidad de la matriz extracelular antes de someterla a la enzima de digestión. Se contempla que uno de los factores que determinan la eficacia del aislamiento de células de la muestra de tejido es el acceso de la enzima de digestión a las células y la matriz extracelular en la muestra. La permeabilidad del cartílago se determina mediante factores químicos y mecánicos, las interacciones de agua y proteoglicano. Se prefiere que el tratamiento para aumentar la permeabilidad de la matriz extracelular, particularmente para tejido cartilaginoso, comprenda aumentar las fuerzas repulsivas entre los glucosaminoglucanos presentes en la matriz extracelular. En una realización preferida, este tratamiento comprende poner en contacto la muestra de tejido con un ácido, base, dimetilsulfóxido (DMSO), catepsina, glicerol o cationes, o cualquier otro agente que pueda aumentar la presión osmótica de Donnan de la matriz extracelular o causar que la matriz extracelular se hinche antes de someterla a la enzima de digestión.

Los ejemplos adecuados de cationes incluyen Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} . Estos pueden introducirse, por ejemplo, en forma de sus sales cloruro, preferiblemente a una concentración entre 10 mM y 2 M. Es un ácido adecuado, por ejemplo, ácido clorhídrico, preferiblemente a una concentración de 10-100 mM, que da como resultado una reducción del pH de la matriz extracelular. Pueden usarse dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol a una concentración entre 5 y 30% v/v. Otros agentes adecuados para esta etapa incluyen etilendiaminotetraacetato de disodio (EDTA) o ácido etilenglicolbis(β -aminoetiléter)-*N,N*-tetraacético (EGTA), ambos usados preferiblemente a una concentración de 0,01-0,1 M) o citrato en tampón Tris, pH 5,8 y 7,4, a 4 y 37°C. Después de aumentar la permeabilidad del tejido, puede lavarse la muestra de tejido, por ejemplo con disolución salina tamponada con fosfato, antes de someterla a una enzima de digestión.

La etapa de aumento de la permeabilidad dura preferiblemente de 1 minuto a no más de 1 hora, preferiblemente manteniendo el tiempo de aislamiento total de las células para que esté dentro del intervalo de 2 horas. Se efectúa preferiblemente a una temperatura entre 17 y 37°C.

La muestra de tejido, posiblemente en forma de fragmentos pequeños, se incuba entonces en una disolución de digestión. La disolución de digestión comprende colagenasa y, opcionalmente, una o más enzimas elegidas del grupo consistente en pronasas, dispasas, tripsinas, hialuronidasas, condroitinasas, elastasas y heparinasas. El tipo de enzima dependerá del tipo de tejido usado. Se contempla también usar diferentes enzimas secuencial o simultáneamente. Para el cartílago, se prefiere usar la colagenasa de tipo II. Es una cantidad adecuada de enzima, por ejemplo, 0,05-20% en peso, preferiblemente menos de 10% en peso, más preferiblemente 0,15-2% en peso, basada en el peso de la disolución de digestión.

Las condiciones (por ejemplo, pH y temperatura) en las que se lleva a cabo un método según la invención se elegirán de tal modo que sean las óptimas para las células que se están aislando y para la enzima de digestión y los otros posibles agentes usados. Con este fin, la disolución de digestión puede comprender adicionalmente agentes tamponadores que ayuden a mantener el pH en un intervalo que se aproxime a las condiciones fisiológicas. Están preferiblemente presentes a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM. Los agentes tamponadores adecuados para uso en la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones citrato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato, fosfato y borato. Adicionalmente, pueden mencionarse tampones de histidina, glicina y urea y tampones tales como Tris, MOPS y HEPES.

La disolución de digestión puede comprender adicionalmente compuestos tales como: agentes quelantes, por ejemplo, ácido dietiltri-aminopentaacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por ejemplo, como Versene™), ácido etileno-bis(oxietileno-nitrilo)tetraacético (EGTA); agentes reductores tales como ditiotritol, ditiotritol, β-mercaptoetanol, glutatión, tiorredoxina, cisteína, etc.; los iones necesarios para la activación de la enzima, tales como CaCl₂, MgCl₂, NaCl y/o KCl; y/o disolventes orgánicos o agentes modificadores de lípidos/membrana tales como dimetilsulfóxido (DMSO); detergentes no iónicos tales como Triton X-100 y/u osmoprotectores tales como sacarosa.

Según la invención, se somete la muestra de tejido a la enzima de digestión durante un periodo de 5 minutos a 1 hora, y más preferiblemente durante un periodo de 10 a 30 minutos. Se prefiere adicionalmente que, si el método comprende un pretratamiento para aumentar la permeabilidad de la matriz extracelular, los periodos de tiempo especificados en este apartado cubran tanto someter la muestra de tejido a la enzima de digestión como el pretratamiento. Como se menciona anteriormente, es una ventaja importante de la invención que se proporcione un método para aislar células que pueda completarse en la duración habitual de un procedimiento quirúrgico para reparar un defecto de tejido, tal como un defecto de tejido cartilaginoso.

Las células aisladas pueden recogerse entonces de la manera habitual, por ejemplo mediante filtración, lavado, centrifugación y/o extracción con perlas magnéticas. Durante esta etapa, las células se separan de la enzima de digestión y los demás posibles agentes usados, terminando así eficazmente el proceso de digestión. Si se desea, la enzima de digestión puede inactivarse antes de esta etapa de separación, por ejemplo, mediante ajuste del pH.

La filtración puede llevarse a cabo vertiendo la suspensión celular que comprende aún la disolución de digestión sobre un filtro de tipo cultivo de tejido. Posteriormente, las células pueden lavarse, por ejemplo, vertiendo disolución salina tamponada con fosfato (PBS) sobre las células que siguen sobre el filtro. Finalmente, las células pueden resuspenderse en un medio adecuado.

El lavado puede llevarse a cabo centrifugando la suspensión celular que comprende aún la disolución de digestión y aspirando el sobrenadante, seguido de resuspensión de las células en un volumen relativamente grande de PBS. Las células pueden centrifugarse entonces. Este procedimiento puede repetirse varias veces para conseguir el grado deseado de lavado.

El aislamiento usando perlas magnéticas puede llevarse a cabo añadiendo perlas magnéticas recubiertas con un receptor general (por ejemplo, integrina α5β1) o un anticuerpo adecuado, a la suspensión celular que aún comprende la disolución de digestión. Las células se unirán a las perlas magnéticas mediante su epítipo expresado en membrana (por ejemplo fibronectina). Con la ayuda de un imán, se concentran las perlas unidas a las mismas en el fondo de un tubo y el sobrenadante puede aspirarse. Las perlas magnéticas con las células pueden lavarse, por ejemplo, con PBS. Este proceso puede repetirse varias veces. Finalmente, las células pueden separarse de las perlas magnéticas mediante tratamiento con tripsina, competición por lavado con tampón que contiene el epítipo (por ejemplo fibronectina) o lavado con una disolución acuosa de HCl 1 mM a 10 mM.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

45 Ejemplo I

Se disecó cartílago de sujetos humanos en cubos de aproximadamente 1 x 1 mm, se incubó en una disolución de colagenasa al 0,15% o 2% (colagenasa de tipo II, disuelta en DMEM, esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22 μm y suplementada con 10% de FBS v/v; aproximadamente 10 ml de suspensión de colagenasa por g de cartílago) en un agitador orbital (xyz) a 37°C y 5% de CO₂ durante 10 o 15 min. A continuación, se separó el cartílago no digerido mediante un filtro celular, se centrifugó la suspensión celular a 4°C y 300 g durante 10-20 minutos, se separó el sobrenadante por aspiración y se repitió la centrifugación dos veces. A continuación, se resuspendieron las células en medio de condrocitos y se contaron las células viables usando tinción con azul de tripano. Se muestran los resultados en la Figura 1.

Ejemplo II

55 Se recuperó cartílago de biopsias de cartílago humano adulto (n= 4) de la tibia. Se trituró el cartílago en trozos de ≤1 mm³. Se transfirió aproximadamente 1 g de cartílago por grupo a tubos de 50 ml y se determinó el peso exacto de cartílago (Tabla 1). Se aislaron los condrocitos mediante pretratamientos diferentes como se describe en la Tabla 1,

seguidos inmediatamente por digestión con colagenasa de tipo II (Worthington) durante 30 minutos. Se filtró la suspensión digerida a través de un filtro de nailon de malla de 100 μm y se centrifugó la suspensión celular resultante a 300 g durante 10 minutos a 4°C. Se lavó el sedimento celular dos veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendió finalmente en 1 ml de PBS. Se determinó el número de células y el número de células muertas con una cámara de recuento Burkert-Turk y tinción con azul de tripano. Se resumen los resultados en la Tabla 1 y la Figura 2.

Tabla 1. Se pretrató cartílago durante 15 minutos (15') con tripsina-EDTA (T) al 0,25%, hialuronidasa (HA) 2 mg/ml en PBS, DMSO, NaCl o una combinación de DMSO + NaCl (nº 9) o NaCl seguido de tripsina-EDTA (nº 10). Todas las muestras experimentales (1-10) se digirieron posteriormente con colagenasa de tipo II al 2% durante 30 minutos. Los controles se digirieron con colagenasa al 2% durante 30 minutos o 120 minutos o durante una noche durante 23 horas con colagenasa de tipo II al 0,15%. La viabilidad celular estaba entre 80 y 95% para todos los grupos.

Tratamiento	Nº total de células	Peso de cartílago (g)	Nº total de células/g	DE	Normalizado respecto al nº 11
1. T 0,25% 15'	$1,42 \times 10^6$	0,83	$1,71 \times 10^6$	$8,9 \times 10^4$	2,63
2. HA 2 mg/ml 15'	$8,40 \times 10^5$	0,84	$1,00 \times 10^6$	$1,48 \times 10^5$	1,54
3. DMSO 1% 15'	$7,40 \times 10^5$	0,84	$8,81 \times 10^5$	$1,56 \times 10^5$	1,35
4. DMSO 5% 15'	$1,08 \times 10^6$	0,99	$1,09 \times 10^6$	$1,70 \times 10^5$	1,67
5. DMSO 10% 15'	$8,98 \times 10^5$	0,9	$9,97 \times 10^5$	$6,01 \times 10^4$	1,53
6. NaCl 140 mM 15'	$7,10 \times 10^5$	0,98	$7,24 \times 10^5$	$7,07 \times 10^4$	1,11
7. NaCl 500 mM 15'	$7,45 \times 10^5$	0,98	$7,60 \times 10^5$	$1,77 \times 10^4$	1,17
8. NaCl 1 M 15'	$7,13 \times 10^5$	0,73	$9,76 \times 10^5$	$1,13 \times 10^5$	1,50
9. DMSO 1% + NaCl 140 mM 15'	$1,02 \times 10^6$	1	$1,02 \times 10^6$	$3,54 \times 10^3$	1,56
10. NaCl 140 mM 15'/T 0,25% 15'	$1,30 \times 10^6$	0,84	$1,55 \times 10^6$	$6,72 \times 10^4$	2,38
11. Col. 2% 30'	$6,25 \times 10^5$	0,96	$6,51 \times 10^5$	$1,41 \times 10^4$	1,00
12. Col. 2% 120'	$1,85 \times 10^6$	0,79	$2,34 \times 10^6$	$1,52 \times 10^5$	3,59
13. Col. 0,15% 23 h	$9,63 \times 10^5$	0,87	$1,09 \times 10^6$	$1,24 \times 10^6$	1,68

Los resultados del número de células muestran que el pretratamiento del cartílago en todos los grupos experimentales da como resultado un rendimiento celular significativamente mayor después de 30 minutos de digestión con colagenasa en comparación con 30 minutos de digestión con colagenasa sola. Los resultados muestran también que el rendimiento celular en los grupos 1-5 y 8-10 no es significativamente diferente o es incluso mayor que con la digestión durante una noche (23 h) con colagenasa de tipo II al 0,15% (Tabla 1, nº 13). Sin embargo, se muestra también que, tras la digestión de colagenasa con colagenasa de tipo II al 2% durante 2 h, el rendimiento celular aumentó aún más que con el pretratamiento (véase también el ejemplo III).

Por tanto, se concluye que, con el pretratamiento de cartílago antes de la digestión con colagenasa, es posible aumentar el rendimiento celular en comparación con la digestión con colagenasa sola. Además, al cabo de 45 minutos, puede establecerse un rendimiento celular similar o mayor mediante una combinación de pretratamiento y digestión con colagenasa a una mayor concentración, en comparación con la digestión convencional de 23 h con colagenasa al 0,15%.

Ejemplo III

Se recuperó cartílago de biopsias de cartílago humano adulto (n=3) de la tibia. Se trituró el cartílago en trozos $\leq 1 \text{ mm}^3$. Se transfirió aproximadamente 1 g de cartílago por grupo a tubos de 50 ml y se determinó el peso exacto de cartílago (Tabla 1). Se aislaron los condrocitos mediante diferentes pretratamientos como se describe en la Tabla 2, seguidos inmediatamente por digestión con colagenasa de tipo II (Worthington) durante 120 minutos. Se filtró la suspensión digerida por un filtro de nailon de malla de 100 μm y se centrifugó la suspensión celular resultante a 300 g durante 10 minutos a 4°C. Se lavó el sedimento celular dos veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendió finalmente en 1 ml de PBS. Se determinaron el número de células y el número de células muertas con una cámara de recuento Burkert-Turk. Se resumen los resultados en la Tabla 2 y la Figura 3.

Tabla 2. Se pretrató cartílago con tripsina-EDTA (T) al 0,25%, hialuronidasa (HA) 2 mg/ml en PBS, DMSO, NaCl o una combinación de DMSO + NaCl (nº 9) o NaCl seguido de tripsina-EDTA (nº 10). Todas las muestras experimentales (1-10) se digirieron posteriormente con colagenasa de tipo II al 2% durante 120 minutos. Los controles se digirieron con colagenasa al 2% durante 30 minutos o 120 minutos o durante una noche durante 23 horas con colagenasa de tipo II al 0,15%. La viabilidad celular estaba entre 80 y 88% para todos los grupos.

Tratamiento	Nº total de células	Peso de cartílago (g)	Nº total de células/g	DE	Normalizado respecto al nº 12
1. T 0,25% 15'	4,81 x 10 ⁶	1,17	4,11 x 10 ⁶	1,84 x 10 ⁵	1,56
2. HA 2 mg/ml 15'	3,17 x 10 ⁶	1,08	2,94 x 10 ⁶	1,27 x 10 ⁵	1,11
3. DMSO 1% 15'	3,88 x 10 ⁶	1,069	3,63 x 10 ⁶	2,26 x 10 ⁵	1,38
4. DMSO 5% 15'	2,79 x 10 ⁶	0,95	2,94 x 10 ⁶	2,97 x 10 ⁶	1,11
5. DMSO 10% 15'	3,38 x 10 ⁶	0,92	3,67 x 10 ⁶	4,53 x 10 ⁶	1,39
6. NaCl 140 mM 15'	2,14 x 10 ⁶	0,8	2,68 x 10 ⁶	2,83 x 10 ⁴	1,01
7. NaCl 500 mM 15'	1,49 x 10 ⁶	1	1,49 x 10 ⁶	1,13x 10 ⁵	0,56
8. NaCl 1 M 15'	1,43 x 10 ⁶	1	1,43 x 10 ⁶	1,06 x 10 ⁵	0,54
9. DMSO 1% + NaCl 140 mM 15'	2,03 x 10 ⁶	0,99	2,06 x 10 ⁶	2,69 x 10 ⁵	0,78
10. NaCl 140 mM 15'/T 0,25% 15'	2,62 x 10 ⁶	1,06	2,47 x 10 ⁶	7,00 x 10 ⁵	0,94
11. Col. 2% 30'	1,15 x 10 ⁶	1,11	1,03 x 10 ⁶	1,31 x 10 ⁵	0,39
12. Col. 2% 120'	2,69 x 10 ⁶	1,02	2,64 x 10 ⁶	3,82 x 10 ⁵	1,00
13. Col. 0,15% 23 h	3,58 x 10 ⁶	1,27	2,82 x 10 ⁶	3,68 x 10 ⁵	1,07

Los resultados de los números de células muestran que el pretratamiento de cartílago en todos los grupos experimentales, excepto los nº 7 y nº 8, da como resultado un rendimiento celular significativamente igual o superior después de 120 minutos de digestión con colagenasa en comparación con la digestión de 120 minutos con colagenasa sola. El pretratamiento con NaCl 500 mM (nº 7) o 1 M (nº 8) da como resultado un rendimiento celular menor tras la digestión con colagenasa de tipo II. Los resultados muestran también que el rendimiento celular en el grupo 1 no es significativamente diferente, o que es incluso mayor, que la digestión durante una noche (23 h) con colagenasa de tipo II al 0,15% (Tabla 1, nº 13).

Por tanto, se concluye que el pretratamiento de cartílago con tripsina o DMSO antes de la digestión con colagenasa posibilita aumentar el rendimiento celular en comparación con la digestión con colagenasa sola. Además, al cabo de 135 minutos, puede establecerse un rendimiento celular similar o mayor mediante una combinación de pretratamiento de cartílago como se describe, seguido de digestión con colagenasa a una concentración mayor en comparación con una digestión de 23 h convencional con colagenasa al 0,15%.

REIVINDICACIONES

1. Método para aislar condrocitos de una muestra de tejido cartilaginoso que comprende:
 - (a) someter la muestra de tejido a una enzima de digestión, usando opcionalmente diferentes enzimas secuencial o simultáneamente, durante un periodo de 5 minutos a 1 hora, y
 - (b) recoger los condrocitos aislados en la etapa (a) mediante la separación de los condrocitos de la enzima de digestión, terminando así eficazmente el proceso de digestión;

en el que en la etapa (a) se usa colagenasa y en el que el tiempo de aislamiento total es menor de 2 horas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de tejido se somete a la enzima de digestión durante un periodo de 10 a 30 minutos.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el cartílago es cartílago articular.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima de digestión se elige del grupo consistente en colagenasas, pronasas, dispasas, tripsinas, hialuronidasas, condroitinasas, elastasas y heparitinasas.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la enzima de digestión es colagenasa de tipo II.
- 15 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los condrocitos aislados se recogen mediante filtración, lavado, centrifugación y/o extracción con perlas magnéticas.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra de tejido se somete a un tratamiento para aumentar la permeabilidad de la matriz extracelular antes de someterla a la enzima de digestión, en el que el tratamiento para aumentar la permeabilidad de la matriz extracelular comprende poner en contacto la muestra de tejido con un ácido, una base, dimetilsulfóxido, catepsina, glicerol o cationes.

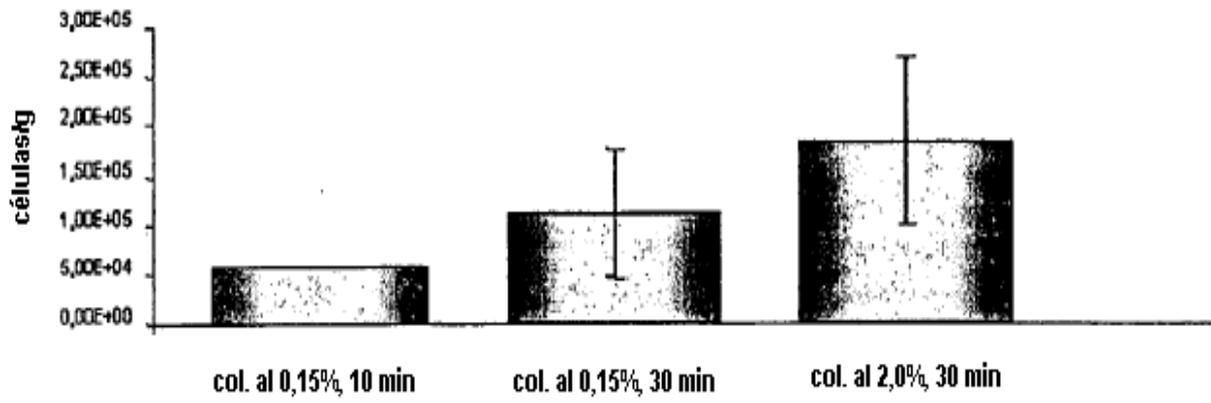


Figura 1

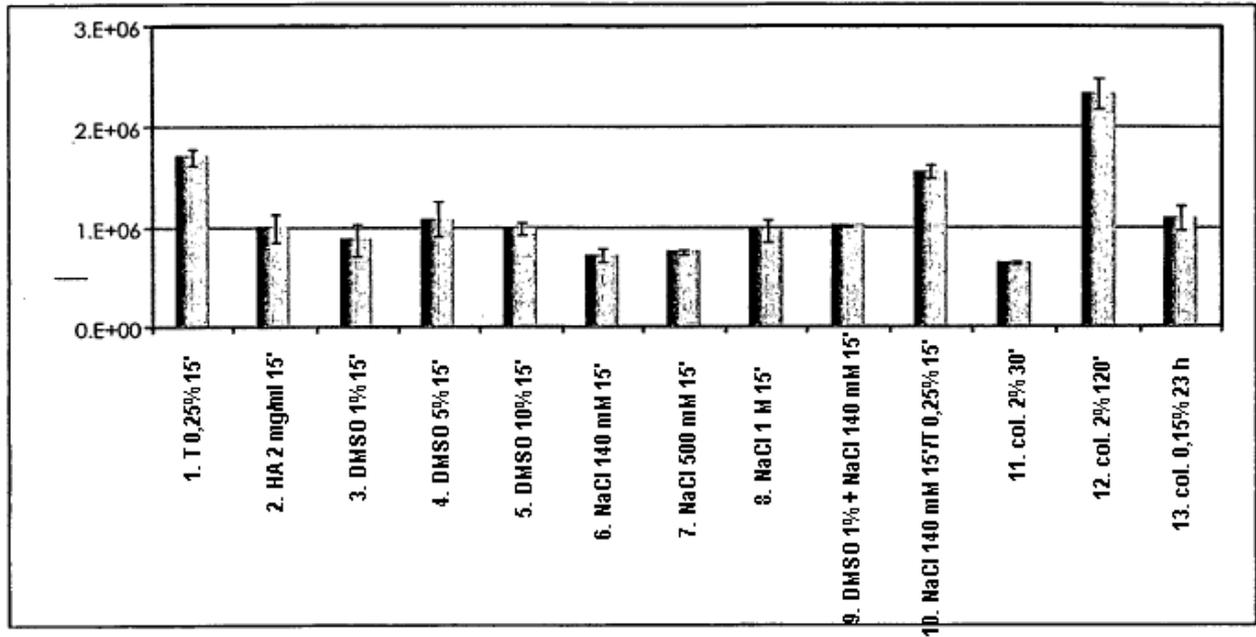


Figura 2

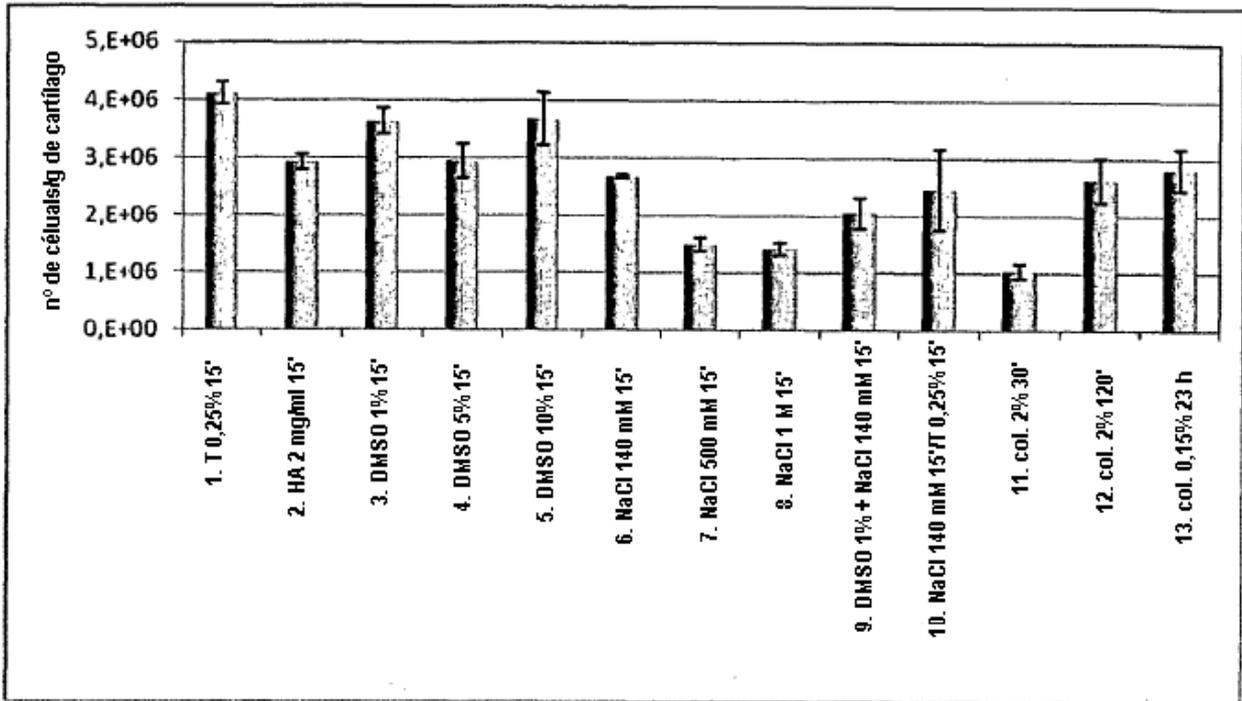


Figura 3