

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 120**

21 Número de solicitud: 201430629

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.04.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.06.2014

71 Solicitantes:

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA -
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (100.0%)
Avda. de los Reyes Católicos, 2
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**ÁLVAREZ GALOVICH, Luis y
DE LA PIEDRA GORDO, Concepción**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Procedimiento de obtención de un aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de un aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente, que comprende (a) cultivar trozos de hueso de dicho paciente en el medio DMEM alto en glucosa (4500 mg/L glucosa), glutamina 1%, piruvato 1%, penicilina/estreptomina 1% y 20% de suero sanguíneo de dicho paciente durante 3-4 semanas, obteniéndose un cultivo de osteoblastos, (b) añadir tripsina y el medio definido en la etapa (a) y centrifugar, eliminando el sobrenadante, (c) sembrar los osteoblastos obtenidos en la etapa (b) y repetir a los 5-9 días la etapa (b), (d) cultivar los osteoblastos obtenidos en la etapa (c) sobre fragmentos de aloinjerto óseo humano en presencia del medio definido en la etapa (a), incubar durante 40-56 horas y centrifugar, eliminando el sobrenadante, añadir suero obtenido del paciente, centrifugar y descartar el sobrenadante, obteniendo el aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente.

ES 2 472 120 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de un aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con el cultivo de osteoblastos sobre aloinjertos. En particular, la presente invención es un procedimiento de obtención de un aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente. El aloinjerto enriquecido con osteoblastos obtenidos de un paciente se puede utilizar en la artrodesis de columna, tratamiento principal de diversas patologías de la columna.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Determinadas patologías de la columna, tales como las discopatías, espondilolistesis, etc., producen una situación de inestabilidad regional que pueden acabar desarrollando un cuadro de dolor y afectación de las estructuras nerviosas adyacentes. El tratamiento de estas patologías está basado en la fusión de los segmentos afectados mediante artrodesis posterolateral de las apófisis transversas de las vértebras. El material considerado como "patrón oro" para conseguir una buena fusión de los segmentos artrodesados es el autoinjerto de cresta iliaca. Sin embargo, el uso del autoinjerto está limitado a un volumen determinado y su uso no está exento de complicaciones hasta en un 30% de los pacientes. Es por ello que durante los últimos años se ha estado investigando en el uso de diferentes alternativas. Entre ellos se encuentra la Matriz Ósea desmineralizada, o los sustitutos de diferentes combinaciones de fosfato cálcico. Todos ellos tienen sus limitaciones, y ninguno ha conseguido unas tasas de artrodesis similares o superiores al autoinjerto. Salvo la BMP.

La BMP es una proteína precursora de hueso, que durante los últimos años ha tomado gran relevancia. Diferentes estudios clínicos demostraban unas tasas de artrodesis similares, e incluso superiores al Autoinjerto, y su uso se ha generalizado, especialmente en la columna. Sin embargo, durante los últimos dos años ha habido una enorme polémica respecto a esos estudios, donde al parecer los datos no eran del todo correctos, y se dejaron de reportar una tasa elevada de serias complicaciones, incluida cáncer.

35 El problema que plantea la técnica consiste en proporcionar un procedimiento a los descritos en el estado de la técnica para obtener un aloinjerto enriquecido con osteoblastos.

La presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, proporciona una solución a este problema técnico.

40 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento de obtención de un aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente, que comprende:

- 45 (a) cultivar trozos de hueso de dicho paciente en el medio DMEM alto en glucosa (4500 mg/L glucosa), glutamina 1%, piruvato 1%, penicilina/estreptomina 1% y 20% de suero sanguíneo de dicho paciente durante 3-4 semanas, obteniéndose un cultivo de osteoblastos, (b) añadir tripsina y el medio definido en la etapa (a) y centrifugar, eliminando el sobrenadante,
- 50 (c) sembrar los osteoblastos obtenidos en la etapa (b) y repetir a los 5-9 días la etapa (b) y (d) cultivar los osteoblastos obtenidos en la etapa (c) sobre fragmentos de aloinjerto óseo humano en presencia del medio definido en la etapa (a), incubar durante 40-56 horas y centrifugar, eliminando el sobrenadante, añadir suero obtenido del paciente, centrifugar y

descartar el sobrenadante, obteniendo el aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente, en adelante, procedimiento de la invención.

5 Otra realización es el procedimiento de la invención, donde en la etapa (c), la etapa (b) se repite a los 7 días.

Y otra realización es el procedimiento de la invención, donde en la etapa (d), se incuba durante 48 horas.

10 El aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente obtenido por el procedimiento de la invención se utilizará en una cirugía de artrodesis de columna.

15 La cirugía está indicada para pacientes con una espondiloartrosis con inestabilidad asociada que no hayan respondido a un tratamiento conservador previo, y que se presenten con dolor lumbar y/o signos de estenosis de canal, con/sin radiculopatía asociada.

20 La intervención quirúrgica se puede realizar aproximadamente 6 semanas después de la biopsia (en el momento de estar completa la etapa (d)). Por una vía posterior estándar se realiza un acceso a la región posterior lumbar. Se realizan las maniobras de descompresión necesarias e instrumentación del segmento inestable con Tornillo Omega 21 cementados. Una vez preparado el espacio intertransverso, con cruentación de la cortical posterior de las transversas, se coloca en un lado 15 cc de aloinjerto fragmentado obtenido por el procedimiento de la invención, y en el lado contralateral 15 cc de aloinjerto fragmentado obtenido por el procedimiento de la invención.

25 El procedimiento de la invención permite obtener un material para injerto con mayor potencial osteogénico, osteoinductor y osteoconductor que el del propio autoinjerto (“patrón oro”), lo que clínicamente supone una mayor la velocidad de incorporación del injerto en la artrodesis de columna

30 El procedimiento de la invención también permite eliminar en el paciente las molestias (dolor, infecciones superficiales, etc.) y posibles complicaciones secundarias a la obtención del autoinjerto (hernia abdominal, lesión vascular, infección profunda, lesión neurológica, fractura del ala ilíaca, disfunción sexual, etc.).

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

40 Ejemplo 1. Evaluación de la acción osteogénica ejercida por la adición de aloinjerto de hueso enriquecido con osteoblastos en la artrodesis de columna, en un modelo animal

45 Se utilizaron conejos de 4,5-5 kg de peso en los que se realiza una artrodesis posterolateral L5-L6 bilateral. Se analizan tres grupos experimentales; APL con autoinjerto de cresta iliaca (Grupo I), APL con aloinjerto de cresta iliaca (Grupo II) y APL con una mezcla de aloinjerto de cresta iliaca enriquecida con un cultivo de osteoblastos durante 48 horas. Los animales fueron sacrificados a las 3 y 6 semanas, realizando un análisis histológico, radiológico y biomecánico de las piezas.

50 Se realizaron ensayos biomecánicos. Los segmentos fusionados se montaron en un sistema para la realización de ensayos biomecánicos. Se aplicó una carga idéntica a los segmentos L5-L6. La distancia de desplazamiento de la vértebra superior se evaluó para reflejar la rigidez de los segmentos de fusión.

Los ensayos biomecánicos demostraron que el grupo III era estadísticamente más rígido a la flexión que los grupos I y II en el pico de resistencia máxima, realizando ensayos de flexión a una velocidad de 0,5 cm/min controlando la carga para un desplazamiento de 1mm, 2mm y 3 mm con el trazador.

5

Se realizó un análisis histológico. Cada masa de fusión, que incluye una porción de dos extremos vertebrales se almacenó en solución de formalina tamponada neutra al 10% a 4 ° C durante 24 horas. Los especímenes no descalcificados se embebieron en metacrilato de metilo y se seccionaron con un microtomo (POLYCUS, Alemania) con un espesor de 5 m. Secciones contiguas se tiñeron con azul de toluidina.

10

En el análisis histológico, el grupo III demostró un desarrollo de la artrodesis mucho más prolífico en crecimiento celular que los grupos I y II. El injerto utilizado tenía un abundante relleno trabecular en el grupo III con proliferación osteoblástica. La mayor complicación encontrada fue que en el grupo III hubo una tasa mas elevada de animales que fallecieron durante las 24 horas de la cirugía.

15

Ejemplo 2. Crecimiento de osteoblastos humanos de acuerdo al procedimiento de la invención.

20

A un grupo de pacientes, se realizó una extracción de 150 cc de sangre, y una punción biopsia con trocar de 1,5 mm en cresta iliaca bajo anestesia local. La muestra se remitió al laboratorio para comenzar el proceso de cultivo de osteoblastos.

25

La sangre se centrifugó para separar el suero que se conservó en alícuotas congelado a -20°C hasta el momento de su uso.

30

Trozos de hueso, procedentes de la biopsia, se colocaron sobre una placa Petri de 10 cm de diámetro con 10 ml de DMEM (4500 mg/L de glucosa y sin rojo fenol ni hepes), suplementado con glutamina al 1%, piruvato 1%, penicilina/estreptomocina 1% y 20% de suero del paciente (medio DMEM 1).

35

La placa quedó completamente cubierta de osteoblastos a las 3-4 semanas. En ese momento, se añadieron 5 ml de tripsina (0.25%-EDTA 1x) que se mantuvieron durante 5 min. Se añadieron entonces 5 ml de medio DMEM 1 y se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 10 min. La tripsina despegó los osteoblastos de la placa. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de medio DMEM 1. Se procedió entonces al conteo celular con una cámara Newbauer.

40

250.000 células se sembraron en frascos F-75. Transcurridos 7 días las células se separaron del F-75 con tripsina de modo análogo al descrito anteriormente.

45

500.000 células se añadieron entonces sobre una placa Petri de 10 cm de diámetro recubierta de aloinjerto humano y con 10 ml de medio DMEM 1. Tras 48 horas de incubación, el aloinjerto se separó de la placa. Se raspó la superficie y el aloinjerto y medio de cultivo con osteoblastos se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 10 ml de suero del paciente. Se agitó suavemente y se volvió a repetir la centrifugación. A continuación se eliminó el sobrenadante y se volvieron a añadir 10 ml de suero del paciente. Esta mezcla de suero y aloinjerto enriquecido en osteoblastos está lista para su uso inmediato en la operación de artrodesis.

50

REIVINDICACIONES

- 5
1. Procedimiento de obtención de un aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente, que comprende:
- 10
- (a) cultivar trozos de hueso de dicho paciente en el medio DMEM alto en glucosa (4500 mg/L glucosa), glutamina 1%, piruvato 1%, penicilina/estreptomicina 1% y 20% de suero sanguíneo de dicho paciente durante 3-4 semanas, obteniéndose un cultivo de osteoblastos,
- 15
- (b) añadir tripsina y el medio definido en la etapa (a) y centrifugar, eliminando el sobrenadante,
- (c) sembrar los osteoblastos obtenidos en la etapa (b) y repetir a los 5-9 días la etapa (b) y
- 20
- (d) cultivar los osteoblastos obtenidos en la etapa (c) sobre fragmentos de aloinjerto óseo humano en presencia del medio definido en la etapa (a), incubar durante 40-56 horas y centrifugar, eliminando el sobrenadante, añadir suero obtenido del paciente, centrifugar y descartar el sobrenadante, obteniendo el aloinjerto enriquecido con osteoblastos de un paciente.
- 25
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa (c), la etapa (b) se repite a los 7 días.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que en la etapa (d), se incuba durante 48 horas.



- ②1 N.º solicitud: 201430629
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 29.04.2014
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	XU L., <i>et al.</i> An experimental study of bioderived bone to repair bone defects as a scaffold of tissue engineering. International surgery Italy Nov-Dic 2008. VOL: 93 No: 6 Págs: 377-380 ISSN 0020-8868 (Impreso). Doi: pubmed:20085049. Ver todo el documento, especialmente páginas 378 y 380.	1-3
X	MIRON, R. J., <i>et al.</i> Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. Journal of dental research United States Dic 2011, VOL: 90 No: 12, Págs: 1428-1433 ISSN 1544-0591 (Electrónico) Doi: doi:10.1177/0022034511422718 pubmed:21940523. Ver todo el documento, especialmente Resumen, primer y segundo partados de Materiales y métodos, y Discusión.	1-3
X	NOLAN, P. C., <i>et al.</i> Culture of human osteoblasts on demineralised human bone. Possible means of graft enhancement. The Journal of bone and joint surgery. British volume ENGLAND Mar 1992 VOL: 74 No: 2 Págs: 284-286 ISSN 0301-620X (Impreso) Doi: pubmed:1312095. Ver todo el documento.	1-3
X	BEGLEY, C. T., <i>et al.</i> The culture of human osteoblasts upon bone graft substitutes. Bone UNITED STATES Jul-Agosto 1993 VOL: 14 No: 4 Págs: 661-666 ISSN 8756-3282 (Impreso) Doi: pubmed:8274310. Ver todo el documento, especialmente Resumen y Materiales y métodos.	1-3
X	HINZE, M. C., <i>et al.</i> Bone engineering-vitalisation of alloplastic and allogenic bone grafts by human osteoblast-like cells. The British journal of oral & maxillofacial surgery Scotland Jul 2010 VOL: 48 No: 5 Págs: 369-373 ISSN 1532-1940 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.bjoms.2009.06.011 pubmed:19596502. Ver todo el documento, especialmente Resumen y primer y segundo apartados de Materiales y métodos.	1-3
X	YANG Y., <i>et al.</i> Naringin induces bone marrow mesenchymal stem cells to repair femoral head necrosis in rabbits. Chinese Journal of Tissue Engineering Research. Journal of Clinical Rehabilitative chn. 01.12.2013 VOL: 16 No: 49 Págs: 9232-9235 (resumen). ISSN 1673-8225 (impreso). Doi: doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.49.020. EMBASE / Elsevier [en línea]. [recuperado el 11.06.2014]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, nº de acceso EMB-2013673924. Ver todo el documento.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.06.2014

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/6



- ②¹ N.º solicitud: 201430629
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 29.04.2014
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NATHER A., <i>et al.</i> Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. <i>Annals of the Academy of Medicine, Singapore</i> Singapore Agosto 2010 VOL: 39 No: 8 Págs: 599-606 ISSN 0304-4602 (Impreso) Doi: pubmed:20838700. Ver todo el documento, especialmente Resumen, Materiales y métodos, y Discusión.	1-3
X	FAN, Z-X., <i>et al.</i> Placenta- versus bone-marrow-derived mesenchymal cells for the repair of segmental bone defects in a rabbit model. <i>The FEBS journal England</i> Jul 2012 VOL: 279 No: 13 Págs: 2455-2465 ISSN 1742-4658 (Electrónico) Doi: doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08625.x pubmed:22564891. Ver todo el documento.	1-3
X	ZOU, X. H., <i>et al.</i> A novel strategy incorporated the power of mesenchymal stem cells to allografts for segmental bone tissue engineering. <i>Cell transplantation United States</i> 2009 VOL: 18 No: 4 Págs: 433-441 ISSN 0963-6897 (Impreso) Doi: doi:10.3727/096368909788809839 pubmed:19622230. Ver todo el documento.	1-3
A	JONSSON, K. B., <i>et al.</i> Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. <i>Acta orthopaedica Scandinavica NORWAY</i> Agosto 1999 VOL: 70 No: 4 Págs: 365-373 ISSN 0001-6470 (Impreso) Doi: pubmed:10569267. Ver todo el documento.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 18.06.2014	Examinador B. Pérez Esteban	Página 2/6
---	---------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/38 (2006.01)

A61F2/28 (2006.01)

C12N5/071 (2010.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, A61F, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, Google académico.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.06.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-3	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	XU L., <i>et al.</i> International surgery Italy Nov-Dic 2008. VOL: 93 No: 6 Págs: 377-380 ISSN 0020-8868 (Impreso). Doi: pubmed:20085049.	Nov-Dic 2008
D02	MIRON, R. J., <i>et al.</i> Journal of dental research United States Dic 2011, VOL: 90 No: 12, Págs: 1428-1433 ISSN 1544-0591 (Electrónico) Doi: doi:10.1177/0022034511422718 pubmed:21940523.	Dic 2011
D03	NOLAN, P. C., <i>et al.</i> The Journal of bone and joint surgery. British volume ENGLAND Mar 1992 VOL: 74 No: 2 Págs: 284-286 ISSN 0301-620X (Impreso) Doi: pubmed:1312095.	Marzo 1992
D04	BEGLEY, C. T., <i>et al.</i> Bone UNITED STATES Jul-Agosto 1993 VOL: 14 No: 4 Págs: 661-666 ISSN 8756-3282 (Impreso) Doi: pubmed:8274310.	Jul-Agosto 1993
D05	HINZE, M. C., <i>et al.</i> The British journal of oral & maxillofacial surgery Scotland Jul 2010 VOL: 48 No: 5 Págs: 369-373 ISSN 1532-1940 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.bjoms.2009.06.011 pubmed:19596502.	Jul 2010
D06	YANG Y., <i>et al.</i> Chinese Journal of Tissue Engineering Research. Journal of Clinical Rehabilitative chn. 01.12.2013 VOL: 16 No: 49 Pags: 9232-9235 (resumen). ISSN 1673-8225 (impreso). Doi: doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.49.020. EMBASE / Elsevier [en línea] [recuperado el 11.06.2014]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, nº de acceso EMB-2013673924.	01.12.2013
D07	NATHER A., <i>et al.</i> Annals of the Academy of Medicine, Singapore Singapore Agosto 2010 VOL: 39 No: 8 Págs: 599-606 ISSN 0304-4602 (Impreso) Doi: pubmed:20838700.	Agosto 2010
D08	FAN, Z-X., <i>et al.</i> The FEBS journal England Jul 2012 VOL: 279 No: 13 Págs: 2455-2465 ISSN 1742-4658 (Electrónico) Doi: doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08625.x pubmed:22564891.	Jul 2012
D09	ZOU, X. H., <i>et al.</i> Cell transplantation United States 2009 VOL: 18 No: 4 Págs: 433-441 ISSN 0963-6897 (Impreso) Doi: doi:10.3727/096368909788809839 pubmed:19622230.	2009
D10	JONSSON, K. B., <i>et al.</i> Acta orthopaedica Scandinavica NORWAY Agosto 1999 VOL: 70 No: 4 Págs: 365-373 ISSN 0001-6470 (Impreso) Doi: pubmed:10569267.	Agosto 1999

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un procedimiento de obtención de un aloinjerto de hueso enriquecido con osteoblastos, que comprende las etapas de obtener trozos de hueso de un paciente y cultivarlos en medio DMEM suplementado con glucosa, glutamina, piruvato, antibióticos y suero del paciente durante 3-4 semanas, para obtener los osteoblastos, tripsinizar el cultivo, centrifugarlo y cultivar durante 40-56 horas los osteoblastos así obtenidos sobre fragmentos de aloinjerto óseo humano en el medio de la etapa anterior, centrifugar, añadir suero al precipitado, centrifugar de nuevo y descartar el sobrenadante, con lo que se obtiene el aloinjerto enriquecido en osteoblastos del paciente.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue un procedimiento con las mismas características técnicas que el reivindicado en la presente solicitud, por lo que las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud se consideran nuevas, según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Se han encontrado, sin embargo, numerosos documentos que divulgan injertos óseos que contienen osteoblastos, y sus procedimientos de obtención, y que, como se comenta a continuación, afectan la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Los documentos D01 a D05 describen injertos constituidos, como el de la solicitud, por fragmentos óseos en los que se siembran osteoblastos aislados de hueso. Si bien los soportes óseos son alogénicos en la mayoría de los ejemplos, en un caso el hueso es autógeno; no se considera que esta diferencia con el estado de la técnica dote a la solicitud de actividad inventiva, pues en ella no se indica que el uso de aloinjertos suponga un avance significativo respecto a los autoinjertos, por lo que la elección de uno u otro soporte sería más bien una mera alternativa al problema técnico planteado. También se aprecian diferencias entre estos documentos y la presente solicitud en cuanto a la manera de aislar los osteoblastos del hueso, ya que en unos casos se emplean procedimientos enzimáticos y en otros se aíslan los osteoblastos por cultivo en medio definido, como en la solicitud. Dado que el solicitante no justifica que el método empleado en la solicitud represente una ventaja frente a los ya existentes en el campo técnico, se considera que el empleo de uno u otro método de obtención (que serían alternativas conocidas en el estado de la técnica), no aporta actividad inventiva a las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud. De hecho, en el documento D02 se describen diferentes técnicas de obtención de osteoblastos, y en el documento D10, citado al final de este informe, también se divulgan varias formas de obtención de osteoblastos a partir de tejido óseo, lo que indica que se trata de procedimientos conocidos y ampliamente utilizados en el estado de la técnica. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud no tienen actividad inventiva a la luz de lo divulgado en los documentos D01 a D05, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D06 se describe también un aloinjerto óseo enriquecido con osteoblastos. La diferencia fundamental con el descrito en la solicitud es que en D06 los osteoblastos no se obtienen de hueso, sino de células madre mesenquimales; de hecho, el artículo consiste en demostrar la utilidad de un compuesto para reparar lesiones óseas por su capacidad de inducir la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblastos, que posteriormente se depositan en aloinjertos óseos y se emplean en regeneración de tejido femoral. A pesar de que en este documento del estado de la técnica la fuente celular sea diferente a la de la solicitud, dado que para la resolución del problema técnico de generar un aloinjerto óseo enriquecido con osteoblastos, se emplean en la solicitud y en D06 opciones ampliamente conocidas en el estado de la técnica, se estima que la información divulgada en D06 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

También en los documentos D07, D08 y D09 se describe la generación de aloinjertos óseos que contienen osteoblastos. La diferencia con los documentos anteriores es que en estos tres casos, los fragmentos óseos se cargan con células madre mesenquimales que se diferencian a osteoblastos en el propio injerto. Como se ha comentado anteriormente, la diferenciación de células madre mesenquimales a células de linaje osteoblástico es ampliamente conocida en el estado de la técnica, por lo que no se considera una mejora significativa emplear osteoblastos aislados de hueso (por técnicas conocidas) en lugar de células madre mesenquimales que se diferenciarán a osteoblastos (proceso también ampliamente conocido en el estado de la técnica). Por consiguiente, también la información divulgada en los documentos D07 a D09 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.