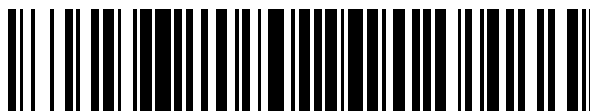


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 231**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 06769014 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2018419**

54 Título: **Procedimiento de separación de células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea**

30 Prioridad:

16.05.2006 KR 20060043936

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.10.2016

73 Titular/es:

**SEWON CELLONTECH CO., LTD. (100.0%)
10, 11TH., GOODMORNING-SHINHAN TOWER 23-
2, YOIDO-DONG
YOUNGDEUNGPO-GU, SEOUL 150-712, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, HYUN-SHIN;
JANG, JAE-DEOG;
LEE, SAE-BOM y
CHANG, CHEONG-HO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 585 231 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

Procedimiento de separación de células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, y más particularmente a un procedimiento que permite la separación rápida y conveniente de células nucleadas obtenidas de médula ósea, que pueden injertarse en un sitio que necesite formación ósea o para el tratamiento de un defecto óseo. De acuerdo con el procedimiento de la invención, la formación ósea en los pacientes de urgencias o pacientes sometidos a operaciones quirúrgicas repetidas puede lograrse eficazmente mediante la separación de las células nucleadas para la formación ósea en lugares quirúrgicos de una manera conveniente y rápida y la inyección de las células separadas en los pacientes.

Técnica anterior

15 De acuerdo con un informe de la OMS, más del 50 % de la población de edad avanzada de 65 años o más sufren enfermedades óseas crónicas, y la tasa de fracturas óseas provocadas por la osteoporosis aumentó en más de dos veces en los últimos diez años. Esto corresponde a más de aproximadamente el 40 % de la población femenina de 50 años o más. En EE.UU., aproximadamente 5.600.000 personas al año sufren una fractura ósea, de las que 3.100.000 personas se someten a una operación quirúrgica. Según los datos estadísticos de los datos médicos internacionales (DMI), se realizaron aproximadamente 426.000 casos de injerto óseo. El coste utilizado para el injerto óseo es de aproximadamente ochocientos millones de dólares al año en todo el mundo, y en el año 1995, se realizaron autoinjertos, aloinjertos e injertos de material sintético en una proporción de aproximadamente el 58 %: 34 %: 8 %.

20 Por lo general, una fractura simple se consolida suficientemente solo con el uso de escayola durante varias semanas, pero en el caso de una fractura o defecto óseo grave, se han realizado operaciones de injerto óseo. Sin embargo, el autoinjerto provoca un dolor intenso en un sitio de obtención del injerto, requiere un período de recuperación largo y resulta difícil obtener un sitio donante de injerto óseo. El aloinjerto tiene un uso muy limitado debido al debilitamiento de la fuerza ósea provocado por esterilización, una respuesta de rechazo inmunitaria, reabsorción y una nueva fractura y tiene un defecto fatal ya que existe una posibilidad de infección, tal como hepatitis o SIDA. Por esta razón, el uso de injertos se ha reducido desde finales de 1993, después de que la Administración de Medicamentos y Alimentos endureciera las regulaciones sobre infección para un banco de tejidos óseos.

30 En otra técnica de injerto óseo, por ejemplo, un metal recubierto con un material cerámico biológicamente activo o inactivo, se utiliza como soporte en cirugía ortopédica. Sin embargo, el uso de metal como material de injerto óseo tiene muchas dificultades debido a problemas tales como la corrosión del metal, la abrasión de la superficie del material cerámico-metal y la formación de tejido fibroso grave en las superficies óseas y del injerto.

35 En cuanto a los factores morfogenéticos óseos, se han estudiado varios factores desde que Urist y Mclean presentaron la morfogénesis ósea de las proteínas morfogénicas óseas en 1952. Sin embargo, estos factores tienen una limitación en su aplicación clínica general, ya que estos son ineficaces ya que se producen usando un proceso complejo y costoso en pequeñas cantidades.

40 La inyección de médula ósea se basa en los informes de Huggins (1931), Friedenstein (1973), Ashton (1980) y similares, que indican que las células osteoprogenitoras de la médula ósea inducen y promueven la formación ósea. Esta inyección de médula ósea se realiza principalmente para la consolidación de fractura ósea sola o en combinación con el injerto óseo. A diferencia de otras técnicas de injerto óseo, no se realiza la incisión cutánea de un del sitio donante, y por lo tanto no tiene ningún problema asociado con el sitio donante. Además, no tiene complicaciones o efectos secundarios.

45 Desde entonces, aunque también se ha informado de buenos resultados a través de la aplicación clínica de la inyección de médula ósea, una parte significativa de los resultados no son constantes. Además, la base teórica de los resultados no está clara porque la cantidad de médula ósea que se puede extraer de un sitio es limitada y el número de células osteoprogenitoras contenidas en la médula ósea es muy limitado.

50 Por lo tanto, es muy eficaz utilizar un procedimiento de injerto óseo novedoso para la formación ósea, que comprende amplificar y cultivar células osteoprogenitoras en un número suficiente de osteoblastos e inyectar los osteoblastos cultivados en un sitio de formación ósea. Aunque este procedimiento tiene muchas ventajas y efectos en comparación con las técnicas de autoinjerto, aloinjerto e inyección de médula ósea existentes, tiene el problema de que, debido a que requiere un periodo de cultivo de 3-4 semanas para la proliferación de los osteoblastos, es difícil de aplicar en los pacientes de urgencias o pacientes que requieren operaciones quirúrgicas repetidas.

Divulgación de la invención

Problema técnico

La presente invención se ha realizado para resolver los problemas descritos anteriormente que se producen en la técnica anterior, y un primer objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, lo que mejora los problemas de implantación, injerto óseo, injerto de osteoblastos cultivados y similares. Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, lo que elimina una respuesta de rechazo clínico mediante la extracción de una pequeña cantidad de médula ósea para la formación ósea, la separación solo de células nucleadas para la formación ósea a partir de la médula ósea, la inyección de las células separadas. Un tercer objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, que logra la formación ósea eficaz en los pacientes de urgencias o pacientes sometidos a operaciones quirúrgicas repetidas, mediante la separación de las células nucleadas para la formación ósea en ubicaciones quirúrgicas de manera rápida y conveniente y la inyección de las células separadas en los pacientes. Un cuarto objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, que permite la inducción eficaz de formación ósea mediante la separación de las células nucleadas de la médula ósea extraída de acuerdo con la presente invención y la inyección de las células separadas en un sitio de formación ósea. Además, un quinto objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, que aumentan en gran medida la fiabilidad de la separación celular, de modo que los usuarios pueden tener una buena imagen de la separación celular.

Solución técnica

Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, que comprende las etapas de: lavado de la médula ósea; lisis de los eritrocitos en la médula ósea; neutralización del lisado de la médula ósea; purificación de las células nucleadas de la médula ósea neutralizada; y mezcla de las células nucleadas con un tampón de mantenimiento para la formación ósea, como se define en la reivindicación 1.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento se describirá con más detalle un modo de realización preferente de la presente invención.

La construcción del procedimiento de la invención para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea es el siguiente.

En la siguiente descripción, se omitirá una descripción detallada de funciones y configuraciones conocidas incorporadas en el presente documento cuando se pueda dificultar la comprensión del objetivo de la presente invención.

Además, los términos descritos a continuación se establecen teniendo en cuenta las funciones de la presente invención. Dado que los términos pueden cambiarse de acuerdo con la intención o la práctica del fabricante, los significados de los términos deben definirse basándose en todo el contenido de la memoria descriptiva.

El procedimiento de la invención comprende las etapas de: lavado de la médula ósea; lisis de los eritrocitos en la médula ósea; neutralización del lisado de la médula ósea; purificación de las células nucleadas de la médula ósea neutralizada mezcla de las células nucleadas con un tampón de mantenimiento para la formación ósea, y la construcción técnica del mismo es la siguiente.

La etapa de lavado de la médula ósea comprende las subetapas de: extracción de 2-5 ml de médula ósea de un paciente y almacenamiento de la médula ósea extraída en un tampón de lavado; agitación del tampón de lavado de la médula ósea para eliminar suficientemente las impurezas o componentes grasos de la médula ósea y centrifugación del tampón de lavado agitado a 1600 rpm durante 4-5 minutos; eliminación del sobrenadante, transferencia del componente de médula ósea restante a otro recipiente de lavado, agitación del recipiente que contiene la médula ósea para lograr una mezcla suficiente, y después centrifugación de la solución agitada a 1600 rpm durante 4-5 minutos; y retirada del sobrenadante de la solución centrifugada.

Además, la etapa de lisis de los eritrocitos comprende las subetapas de: adición de una cantidad 10 veces mayor de un tampón de lisis a la médula ósea; y mezcla del tampón de lisis con la médula ósea varias veces usando una jeringa y luego se deja reposar la solución durante 10-20 segundos.

Además, la etapa de neutralización de la solución de la médula ósea comprende las subetapas de: mezcla de la solución de la médula ósea con la misma cantidad de un tampón de neutralización; y la centrifugación de dicha solución a 1600 rpm durante 4-5 minutos y después eliminación del sobrenadante a excepción de las células nucleadas precipitadas para la formación ósea.

Además, la etapa de purificación de las células nucleadas comprende las subetapas de: mezcla de 4-5 ml de un tampón de mantenimiento con las células nucleadas en un recipiente; y centrifugación de dicha solución a 1600 rpm durante 4-5 minutos y después eliminación del sobrenadante.

Además, la etapa de la mezcla de las células nucleadas con el tampón de mantenimiento comprende las subetapas de: adición de 2-3 ml del tampón de mantenimiento a las células nucleadas en vista de una lesión y después, resuspensión de las células nucleadas del fondo del recipiente usando una jeringa; y colocación de las células nucleadas y el tampón de mantenimiento en una jeringa, y a continuación, inyección del contenido de la jeringa en un sitio con un defecto óseo o un sitio que necesite formación ósea.

Modo de la invención

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, las células nucleadas obtenidas de la médula ósea para la formación ósea, que pueden injertarse en un sitio que necesite tratamiento por defectos óseos o para formación ósea, pueden separarse en una ubicación quirúrgica de manera rápida y conveniente. Un ejemplo del procedimiento de acuerdo con la presente invención es el siguiente.

Ejemplo

En primer lugar, se prepara un kit para la separación de las células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea para tener la siguiente construcción:

- 1) dos soluciones para el almacenamiento y el lavado de la médula ósea extraída;
- 2) tampón de lisis para eritrocitos;
- 3) tampón de neutralización;
- 4) tampón de mantenimiento para la formación ósea; y
- 5) jeringa para injerto óseo

Usando la construcción del kit anterior, el procedimiento de la invención para la separación de células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea puede llevarse a cabo de la siguiente manera.

- 1) Se extraen 2-5 ml de médula ósea de un paciente y se almacenan en la solución de lavado. Al extraer médula ósea de la cresta ilíaca, la cantidad de médula ósea pura es aproximadamente de 2-5 ml, y un extracto superior a dicha cantidad corresponde a los componentes de la sangre periférica. Por lo tanto, para la extracción de médula ósea pura es eficaz extraer la médula ósea en una cantidad de 2-5 ml.
- 2) Se agita un recipiente que contiene la médula ósea en la solución de lavado para eliminar suficientemente las impurezas o componentes lipídicos de la médula ósea, y después se centrifuga la solución a 1600 rpm durante 5 minutos. La velocidad de centrifugación (rpm) y el tiempo son las condiciones mínimas a las que las células precipitan sin sufrir daños.
- 3) Después de retirar el sobrenadante, el componente de médula ósea que queda en el fondo del recipiente se transfiere a una segunda solución de lavado, y el recipiente que contiene la médula ósea se agita para mezclar suficientemente la médula ósea con la segunda solución de lavado, y después se centrifuga la solución a 1600 rpm durante 5 minutos.
- 4) Después de retirar el sobrenadante, se añade una cantidad de 10 veces de un tampón de lisis para eritrocitos a la solución de la médula ósea restante. La cantidad de 10 veces del tampón de lisis sirve para lisar los eritrocitos en la solución de la médula ósea mediante presión osmótica, mientras se minimiza el daño de las células nucleadas.
- 5) El tampón de lisis y la solución de la médula ósea se mezclan varias veces entre sí utilizando una jeringa y luego se dejan en reposo durante 10-20 segundos para lograr la lisis de los eritrocitos.
- 6) Se añade la misma cantidad de un tampón de neutralización a la médula ósea y después se agita cuidadosamente para mezclar el tampón de neutralización con la médula ósea. El tampón de neutralización utilizado en el presente documento es un tampón concentrado 10 veces.
- 7) Después de centrifugar dicha solución a 1600 rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante a excepción de las células nucleadas precipitadas para la formación ósea.
- 8) Se añade un tampón de mantenimiento para la formación ósea en el recipiente que contiene las células nucleadas y a continuación se agita varias veces.
- b) La solución se centrifuga a 1600 rpm durante 5 minutos y se retira el sobrenadante;
- 10) Se añade un tampón de mantenimiento para la formación ósea a las células en una cantidad seleccionada en vista del tamaño de una lesión, y después se resuspenden las células del fondo del recipiente usando una jeringa.
- 11) Las células nucleadas para la formación ósea y el tampón de mantenimiento para la formación ósea se colocan en la jeringa y después se inyectan en un sitio con un defecto óseo o un sitio que necesite formación ósea.

De acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, las células nucleadas para la formación ósea se separan de la médula ósea extraída del paciente y se inyectan en el sitio que necesite formación ósea, y por lo tanto no se produce una respuesta de rechazo clínico. También, debido a que las células nucleadas para la formación ósea se separan y se injertan en un corto periodo de tiempo después de la extracción de la médula ósea, la formación ósea se puede inducir de manera eficaz y rápida.

Aplicabilidad industrial

Como se describe en detalle anteriormente, la presente invención tiene como objetivo mejorar los problemas que se producen en la implantación, injerto óseo, injerto de osteoblastos cultivados, y similares. En particular, de acuerdo con la presente invención, se elimina una respuesta de rechazo clínico mediante la extracción de una pequeña cantidad de médula ósea para la formación ósea, la separación solo de las células nucleadas para la formación ósea de la médula ósea, y la inyección de las células separadas.

También, de acuerdo con la presente invención, la formación ósea eficaz en los pacientes de urgencias o pacientes sometidos a operaciones quirúrgicas repetidas se logra mediante la separación de las células nucleadas para la formación ósea en lugares quirúrgicos de una manera rápida y conveniente y la inyección de las células separadas en los pacientes.

Además, de acuerdo con la presente invención, la formación ósea eficaz puede inducirse mediante la separación de las células nucleadas de la médula ósea extraída de acuerdo con la presente invención y la inyección de las células separadas en un sitio de formación ósea.

Como resultado, de acuerdo con la presente invención, la fiabilidad de la separación celular puede aumentar en gran medida de tal manera que los usuarios puedan tener una buena imagen de la separación celular.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para separar células nucleadas obtenidas de médula ósea para la formación ósea, que comprende las etapas de:
 - (a) lavado de la médula ósea, que comprende las subetapas de:
 - 5 (a1) almacenamiento de 2-5 ml de médula ósea extraída de un paciente en un tampón de lavado;
 - (a2) agitación del tampón de lavado de médula ósea 40-50 veces para eliminar suficientemente las impurezas o componentes lipídicos de la médula ósea,
 - (a3) centrifugación del tampón de lavado agitado a 1600 rpm durante 4-5 minutos;
 - (a4) retirada del sobrenadante,
 - 10 (a5) transferencia del componente de médula ósea restante a otro recipiente de lavado,
 - (a6) agitación del recipiente que contiene la médula ósea 40-50 veces,
 - (a7) centrifugación de la solución agitada a 1600 rpm durante 4-5 minutos, y
 - (a8) retirada del sobrenadante de la solución centrifugada;
 - (b) lisis de los eritrocitos de la médula ósea, que comprende las subetapas de:
 - 15 (b1) adición de una cantidad de 10 veces un tampón de lisis a la médula ósea; y
 - (b2) mezcla del tampón de lisis con la médula ósea varias veces utilizando una jeringa, y
 - (b3) reposo de la solución durante 10-20 segundos;
 - (c) neutralización del lisado de la médula ósea, que comprende las subetapas de:
 - 20 (c1) mezcla de la solución de la médula ósea con la misma cantidad de un tampón de neutralización;
 - (c2) centrifugación de dicha solución a 1600 rpm durante 4-5 minutos, y
 - (c3) eliminación del sobrenadante a excepción de las células nucleadas precipitadas para la formación ósea;
 - (d) purificación de las células nucleadas de la médula ósea neutralizada, que comprende las subetapas de:
 - 25 (d1) mezcla de 4-5 ml de un tampón de mantenimiento con las células nucleadas en un recipiente; y
 - (d2) centrifugación de dicha solución a 1600 rpm durante 4-5 minutos, y
 - (d3) eliminación del sobrenadante; y
 - (e) mezcla de las células nucleadas con un tampón de mantenimiento para la formación ósea.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (e) de mezcla de las células nucleadas con el tampón de mantenimiento comprende las subetapas de:
 - 30 (e1) adición de 2-3 ml del tampón de mantenimiento a las células nucleadas en vista de una lesión,
 - (e2) resuspensión de las células nucleadas del fondo del recipiente usando una jeringa; y
 - (e3) colocación de las células nucleadas y del tampón de mantenimiento en una jeringa para la inyección en un sitio con un defecto óseo o un sitio que necesite formación ósea.