

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 017**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2014 PCT/IB2014/065077**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15052627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2014 E 14798955 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 3055691**

54 Título: **Método para la recuperación de células madre a partir de sangre humana y animal utilizando una mezcla de oxígeno-ozono**

30 Prioridad:

**09.10.2013 IT MI20131667**

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

**27.03.2018**

73 Titular/es:

**PAOLO GOBBI FRATTINI S.R.L. (100.0%)  
Viale Lazio, 26  
20135 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GOBBI FRATTINI, PAOLO GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 661 017 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**

Método para la recuperación de células madre a partir de sangre humana y animal utilizando una mezcla de oxígeno-ozono

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para recuperar células estaminales (madre) eficaces a partir de sangre humana y animal.

10 **Técnica anterior**

Actualmente hay varias técnicas para separar células sanguíneas con el fin de recuperar una población celular de interés, en particular, una población de células madre.

15 Sin embargo, la mayoría de las técnicas conocidas para separar las células sanguíneas incluye al menos una etapa de centrifugación que puede llegar a ser una causa de tensión y posible daño de las células. Dichas células dañadas de esta manera serán menos eficaces cuando se trasplantan en el paciente.

20 Por lo tanto, existe la necesidad de implementar un método para obtener la recuperación de células madre que tengan mejor "calidad" y eficacia y reducir el daño debido al procedimiento de separarlas de las células sanguíneas.

Salma Hassan et al: "Isolation of Human Blood Progenitor and Stem Cells from Peripheral Blood by Magnetic Bead", Bio-Protocol, 2012, desvela un procedimiento para el aislamiento de células CD34+ de la sangre periférica.

25 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método eficaz para obtener células madre que tengan una mejor calidad.

30 **Sumario de la invención**

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la recuperación de células madre como se define en la reivindicación 1.

35 El solicitante de la presente solicitud ha descubierto sorprendentemente que un método eficaz para recuperar células madre comprende una etapa preliminar de pre-tratamiento de las sanguíneas de la sangre del paciente utilizando una mezcla de oxígeno-ozono antes de su uso posterior en una etapa de separación de las células madre.

40 De hecho, dicha etapa preliminar de pre-tratamiento de la sangre permite una mejor calidad de células sanguíneas y se va a obtener una multiplicación de las mismas, en particular de las células madre, independientemente de la técnica que se utilice entonces para la separación de células madre y en particular a continuación de etapas adicionales de criopreservación y descongelación.

Las células madre de la sangre pre-tratada con dicha mezcla de oxígeno-ozono antes de la separación son más numerosas, viables y activas, aumentando de esta manera su eficacia cuando se trasplantan en el paciente.

45 Dicha mezcla de oxígeno-ozono usa cantidades y concentraciones adecuadas de dichos componentes de la mezcla; dicha mezcla de oxígeno-ozono preferentemente comprende desde un 40 % a un 60 % en peso de oxígeno (O<sub>2</sub>) y desde un 60 % a un 40 % en peso de ozono (O<sub>3</sub>), más preferentemente desde un 45 % a un 55 % en peso de oxígeno y desde un 55 % a un 45 % en peso de ozono, con respecto al peso total de la mezcla. Más preferentemente, dicha mezcla comprende oxígeno y ozono en una relación de 1:1 peso/peso.

Preferentemente, en dicha mezcla de oxígeno-ozono, la concentración de ozono es desde 20 µg/ml a 60 µg/ml, más preferentemente desde 40 µg/ml a 50 µg/ml.

55 De hecho, por una parte, cuando la concentración de ozono en dicha mezcla de oxígeno-ozono es menor de 20 µg/ml, no se conseguían resultados eficaces mientras que, por otra parte, cuando la concentración de ozono en dicha mezcla de oxígeno-ozono es mayor de 60 µg/ml, la práctica de una auto-hemotransfusión principal, es decir, la recolección y re-infusión de una cantidad significativa de sangre mezclada con una cantidad predeterminada de oxígeno-ozono, por ejemplo aproximadamente 200-250 cc, no se permite.

60 Una vez que las células sanguíneas se han pre-tratado con dicha mezcla de oxígeno-ozono, se pueden separar por medio de cualquier técnica de separación.

65 Dicha etapa de separación celular es necesaria para administrar al paciente la fracción necesaria para corregir el problema específico o para criopreservar solamente la población celular de interés, en particular, células madre, por ejemplo, del cordón umbilical, médula ósea, sangre periférica u otros.

La separación preferentemente tiene lugar en primer lugar produciendo un líquido biocompatible capaz de separar los diferentes componentes celulares de la sangre (glóbulos rojos, capa leucocítica y plasma) sin ayuda de una centrífuga y con una eficacia de separación en poco tiempo. El líquido mencionado anteriormente necesita asegurar una separación limpia y un aislamiento de los glóbulos rojos de los otros componentes celulares de la sangre. El líquido de interés puede ser esterilizable por rayos gamma y ser compatible con dimetil sulfóxido (DMSO). La sangre de partida es sangre completa y el objetivo final es la recuperación de la fracción de glóbulos blancos que contienen las células madre.

Por ejemplo:

**Composición líquida:**

POLÍMERO

- 250 KDa 5 % p/p Dextrano
- 500 KDa 15 % p/p Dextrano

X3,0 TAMPÓN

- 0,137 M de NaCl
- 5,4 mM de KCl
- 0,25 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,44 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,3 mM de CaCl<sub>2</sub>
- 1,0 mM de MgSO<sub>4</sub>
- 4,2 mM de NaHCO<sub>3</sub>

**Método**

Las diluciones deseadas se seleccionan y de acuerdo con las mismas se calculan las cantidades de polímero y tampón que se van a añadir a la sangre.

La mezcla de polímero+tampón se añade a la bolsa de sangre. La bolsa de sangre se agita suavemente para permitir una difusión uniforme de la mezcla en la sangre.

La bolsa se cuelga y se deja ahí, de manera que se permite actuar a la solución.

A simple vista es posible observar si se consigue la separación de los diferentes componentes de la sangre (glóbulos rojos, capa leucocítica y plasma), y se calcula el tiempo necesario para obtener una separación clara.

Ej.

BOLSA NO.	PT UCB	LÍQUIDO	SANGRE (ml)	DILUCIÓN (%)	RELACIÓN DE VOLUMEN	POLÍMERO (ml)	TAMPÓN (ml)
2	PD	ST	70	6 %	1: 1	4,2	65,8
3	PP	ST	92	6 %	11	5,52	86,48
4	BD	ST	52	6 %	11	3,12	48,88

Se llevaron a cabo los siguientes ensayos sobre una muestra de "línea base" (antes de la separación) y en una muestra manipulada (después de la separación).

- Hemograma
- Viabilidad por citometría de flujo
- Expresión de CD34 por citómetro de flujo
- Ensayo clonogénico: por ejemplo, sembrando 45 x 10<sup>3</sup> células en medio MethoCult GFH8

De manera alternativa, dicha etapa de separación de células sanguíneas tiene lugar por medio de la técnica de

centrifugación, de acuerdo con la cual la sangre completa se recolecta en primer lugar del donante y entonces se deja fluir en un sistema de centrifugación en el que, por un proceso que acelera la sedimentación, permite que las células se separen entre ellas y se separen del plasma.

- 5 La centrifugación es una técnica que se aprovecha de la fuerza generada por una centrífuga y se utiliza en el laboratorio para purificar complejos macromoleculares, micelas, células y grandes estructuras celulares, material extracelular, etc., basándose en su densidad diferente con respecto al medio en el que se suspenden o dispersan.

10 El material que se va a centrifugar se coloca habitualmente en tubos que se acomodan en el rotor de una centrífuga. El rotor gira a alta velocidad (hasta 100.000 revoluciones por minuto) durante un cierto tiempo, sometiendo de esta manera la suspensión a fuerzas centrífugas iguales o varias veces la fuerza de la gravedad, que produce la sedimentación de partículas que tienen incluso ligeras diferencias de densidad con respecto al medio en el que están.

- 15 A partir de una cierta cantidad de material celular habitualmente se separan dos fracciones: el aglomerado, que es un material compacto que permanece en el fondo, y el sobrenadante, que es todo lo que queda en suspensión.

20 De manera alternativa, dicha etapa de separación de células sanguíneas tiene lugar preferentemente por medio de la técnica de filtración, de acuerdo con la cual la sangre completa recolectada del donante se deja fluir en un módulo de filtrado de membranas microporosas que permiten la separación de las moléculas proteicas del plasma de las células, que no pueden cruzar dichas membranas.

25 Además, en una alternativa adicional, dicha etapa de separación de las células sanguíneas tiene lugar por medio de la combinación de la filtración mencionada anteriormente y técnicas de centrifugación, en el que la sangre fluye en un cilindro que contiene una membrana fabricada preferentemente de policarbonato con poros de tamaño pequeño (unos pocos micrómetros). La centrifugación permite que los distintos constituyentes de la sangre se separen y que la rotación envíe las células lejos de la membrana, evitando así la saturación del filtro. La solución que contienen las células se permite entonces fluir a un depósito, mientras que el plasma (que contiene plaquetas o no, dependiendo del procedimiento) va a la bolsa de recolección.

30 Las características y ventajas adicionales del presente hallazgo serán más evidentes a partir de la consideración de la descripción detallada siguiente de una realización preferida pero no exclusiva, que se ilustra mediante un ejemplo no limitante.

### 35 **Descripción detallada**

La siguiente descripción detallada se refiere a una realización particular de la invención, que ha confirmado la validez y ventajas del método reivindicado.

- 40 Mediante el uso de una jeringa, se recolecta una cantidad pre-determinada de una mezcla de oxígeno-ozono a la concentración de interés y se añade a una bolsa que contienen la sangre que se va a someter a la etapa de separación celular. A continuación, se lleva a cabo el procedimiento de separación celular.

### 45 **Ejemplo 1 (Invención)**

50 Se recolectó una mezcla de oxígeno-ozono con una relación oxígeno-ozono de 1:1 y una concentración de ozono de aproximadamente 40 µg/ml; dicha mezcla se añadió a una bolsa que contenía sangre; a continuación la bolsa se agitó durante unos segundos para permitir que la mezcla de oxígeno-ozono se distribuya uniformemente por la sangre de la bolsa.

55 Una cierta cantidad de la sangre pre-tratada con dicha mezcla de oxígeno-ozono se recolectó en primer lugar de dicha bolsa con una jeringa acondicionada con heparina, citrato u otro anticoagulante para evitar que la sangre se coagule y, entonces, se transfirió a la jeringa a un depósito, presionando el émbolo muy lentamente para evitar que se rompan las células.

60 En otro depósito, se colocó aproximadamente la mitad de volumen – con respecto al de sangre – de Histopaque® 1077 (disponible en Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA), una solución no estéril basada en polisacarosa y diatrizoato de sodio corregido a una densidad de 1,077 ± 0,001 g/ml, a temperatura ambiente. En el depósito que contienen el Histopaque® 1077 se añadió un volumen de sangre diluido con solución salina muy lentamente, de manera que las dos soluciones se mantuvieran separadas. La mezcla obtenida se centrifugó a 150 rpm durante 30 minutos a 25 °C, obteniendo 4 fases distintas, glóbulos rojos en el fondo, Histopaque® 1077 ligeramente por encima, después un anillo fino de células mononucleares y el plasma en la parte de arriba.

65 Con la ayuda de un extractor de succión se extrajo el anillo celular, se transfirió un depósito y se llevó a 50 ml con solución salina. A continuación se re-suspendió, se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min a 25 °C; esta operación se repitió varias veces hasta que se eliminaron todos los sobrenadantes.

Las células separadas de esta manera se lavaron y almacenaron a una temperatura de -4 °C.

5 De manera alternativa, el líquido biocompatible descrito anteriormente se podría haber utilizado en vez de la centrifugación con efectos particularmente ventajosos.

**Ejemplo 2 (Comparación)**

10 Se tomó una bolsa de sangre similar a la que se utilizó en el Ejemplo 1, excepto que dicha bolsa no se sometió a la etapa de pre-tratamiento con la adición de la solución de oxígeno-ozono.

Las células contenidas en dicha bolsa se sometieron a la misma etapa de separación como se describe en el Ejemplo 1.

15 Ensayo de evaluación

La bolsa 1 que contenía las células obtenidas por medio del pre-tratamiento de la invención descrito en el Ejemplo 1 y la bolsa 2 que contenía las células obtenidas como se describe en el Ejemplo comparativo 2 (sin dicho pre-tratamiento) se evaluaron por medio de un ensayo de evaluación convencional.

20 Los ensayos de evaluación convencional se basan habitualmente en el análisis de la viabilidad celular y el recuento de células CD34+ (marcador antigénico común a los progenitores hematopoyéticos que se puede reconocer por anticuerpos monoclonales) que podrían participar en la formación, auto-reproducción y diferenciación de las células madre.

25 La viabilidad celular de las células adheridas o en suspensión contenidas en a bolsa 1 y la bolsa 2 descritas anteriormente se evaluó con técnicas de citometría, utilizando 7-aminoactinomicina, por ejemplo, o poniendo en contacto las células con una solución de colorante de Azul Tripán (0,4 %) (disponible por ejemplo en Sigma-Aldrich como T-8154) durante 5 minutos. A continuación de dicho tratamiento, las células vivas no tomaban el colorante y aparecían refractarias, mientras que las células muertas aparecían teñidas de azul ya que perdían su capacidad d  
30 excluir el colorante.

35 El recuento de células CD34+ se evaluó por medio de citometría de flujo, por ejemplo con 7-aminoactinomicina, cuya tecnología permite que se analice un gran número de células en poco tiempo (50.000 células en pocos segundos) y se cuantifican varios parámetros para cada célula individual basándose en la información proporcionada por un rayo de luz que cruza cada célula individual y determina la emisión de una señal de fluorescencia de la misma.

40 Las células de la bolsa 1 que se sometieron al pre-tratamiento de la presente invención presentaban un aumento considerable del número de CD34+ con respecto a las de la bolsa 2 no sometidas a dicho pre-tratamiento.

45 Además, las células de la bolsa 1 y la bolsa 2 también se sometieron a un ensayo de proliferación, que es un ensayo que se utiliza para confirmar cualquier efecto sobre la tasa de proliferación debido a células dañadas o muertas. Dicho ensayo proporciona las células en crecimiento exponencial para ser sembradas en placas e incubadas en condiciones de cultivo convencionales; se utilizaron células no tratadas y células tratadas con disolvente solo como controles negativos.

50 A continuación de dicho ensayo de proliferación, las células de la bolsa 1 que se sometieron al pre-tratamiento de la presente invención también presentaban un mejor estado y un aumento de calidad de las mismas células (las células madre proliferaban bien) y la presencia de marcadores de células madre, tal como, por ejemplo, para las células madre hematopoyéticas CD14, CD34 y CD45, con respecto a las de la bolsa 2 no sometidas a dicho pre-tratamiento.

55 Por lo tanto, las células madre de sangre completa pre-tratada con una mezcla de oxígeno-ozono antes de la separación, de acuerdo con el método de la presente invención, eran más numerosas, viables y activas. Por lo tanto, su eficacia aumenta cuando se trasplantan en un paciente.

60 Se debería señalar que en la solicitud EP 0 607 593 A2 ya se había descrito un método que incluye la "fumigación" de cultivos celulares de distintos orígenes (sangre completa, leucocitos, linfocitos, orina) con una mezcla de gas de oxígeno-ozono para la producción de citocinas, que son mensajeros celulares producidos por las células que tienen varios papeles de "comunicación" entre las mismas células. La solicitud mencionada anteriormente establece que la mezcla de oxígeno-ozono es capaz de activar el metabolismo de las células y por lo tanto e aumentar la producción de citocinas. Se reivindica que el uso terapéutico de citocinas producidas con dicho método en tumores malignos es mejor que el uso de células madre.

65 En la solicitud EP 0 607 593 A2 no se hace referencia al tratamiento de células sanguíneas con oxígeno-ozono con el fin de recuperar células madre más numerosas, activas y viables.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para recuperar células madre de la sangre recolectada de un paciente, **caracterizado porque** comprende una etapa preliminar de pre-tratamiento de las células sanguíneas utilizando una mezcla de oxígeno-ozono y una etapa posterior de separación de las células madre a partir de dichas células sanguíneas.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de oxígeno-ozono comprende desde un 40 % a un 60 % en peso de oxígeno y desde un 60 % a un 40 % en peso de ozono, con respecto al peso total de la mezcla.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de oxígeno-ozono comprende desde un 45 % a un 55 % en peso de oxígeno y desde un 55 % a un 45 % en peso de ozono, con respecto al peso total de la mezcla.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de oxígeno-ozono comprende oxígeno y ozono en una relación de 1:1 peso/peso.
- 20 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha mezcla de oxígeno-ozono, la concentración de ozono es desde 20 µg/ml a 60 µg/ml.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la concentración de ozono es desde 40 µg/ml a 50 µg/ml.
- 25 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, en el que la etapa de separación de las células madre, después de dicha etapa preliminar de pre-tratamiento, tiene lugar por medio de cualquier técnica para la separación de células sanguíneas.
- 30 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho método para la separación de las células sanguíneas tiene lugar utilizando un líquido biocompatible capaz de separar los diferentes componentes celulares de la sangre sin ayuda de una centrifuga y con una eficacia de separación en poco tiempo.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho líquido biocompatible es esterilizable por rayos gamma y compatible con dimetil sulfóxido.
- 35 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha separación de células madre tiene lugar por centrifugación.