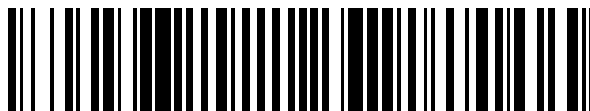


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 308**

21 Número de solicitud: 201131556

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.09.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.04.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100.0%)
PLAZA DE EL EJIDO, S/N
29071 MÁLAGA ES**

72 Inventor/es:

**MATEOS GRONDONA, Jesús;
GRANADOS DURÁN, Pablo;
CIFUENTES RUEDA, Manuel;
PÉREZ MARTÍN, Margarita;
PÉREZ RODRÍGUEZ, Juan;
FERNÁNDEZ-LLEBREZ Y DEL REY, Pedro y
LÓPEZ ÁVALOS, María Dolores**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE UN CULTIVO PURO DE CÉLULAS EPENDIMARIAS MULTICILIADAS.**

57 Resumen:

La presente invención describe un procedimiento de obtención de un cultivo puro de células endimarias multiciliadas a partir de explantes de la pared ventricular de cerebros de roedores adultos. Las células endimarias se separan del explante mediante la incubación en un medio de cultivo a baja temperatura seguida por una digestión proteolítica. Tras 24 horas de cultivo del explante se desprenden la mayoría de las células endimarias y un 7% de otros tipos celulares. Las células endimarias se purifican tras 48 horas de cultivo en un medio esencial sin aditivos ni factores de crecimiento y a una baja densidad celular. En estas condiciones sólo sobreviven las células endimarias y las escasas células contaminantes mueren, de tal forma que se obtiene una suspensión pura de células endimarias.

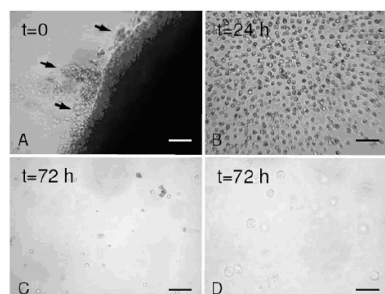


Fig. 2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de un cultivo puro de células endimarias multiciliadas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 Los cultivos puros representan un modelo de estudio necesario para la investigación de células endimarias multiciliadas, y de forma más general para el estudio de las células ciliadas. La invención queda comprendida en el campo de los cultivos celulares en biología celular, en biomedicina y farmacología.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las células endimarias son células epiteliales que tapizan las cavidades ventriculares del cerebro y el canal central de la médula espinal de los vertebrados.

- 10 El epitelio endimario multiciliado ocupa y tapiza la interfase entre el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el parénquima nervioso. Por su localización y sus uniones intercelulares se ha propuesto su función como barrera ante determinadas sustancias nocivas para el sistema nervioso que pudieran llegar hasta el LCR, en la formación del propio LCR o participando en el transporte de ciertas sustancias entre ambos compartimentos. Asimismo, las células endimarias son responsables de la movilidad del líquido cefalorraquídeo gracias a la presencia de un penacho de cilios móviles en su porción apical.

- 15 Además de estas funciones, destaca su más que probable participación en la formación y el desarrollo del sistema nervioso central y un papel de soporte trófico y metabólico de la neurogénesis que tiene lugar en regiones muy concretas del sistema nervioso adulto. También se ha probado la importancia de este epitelio en el mantenimiento de la integridad del sistema ventricular, ya que tanto su destrucción como alteraciones en su adhesión a la membrana basal o en su motilidad ciliar generan patologías muy variadas, entre las que destaca la hidrocefalia.

Con respecto a la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto, se ha demostrado la presencia de células madre neurales en la zona subventricular de los ventrículos laterales de cerebros de roedores adultos.

- 25 En la pared estriatal, los nichos neurogénicos están formados por un tipo especial de astrocitos subependimarios, su progenie o células de amplificación, los neuroblastos procedentes de las anteriores, las células endoteliales de los vasos locales y las células endimarias locales. Además de estos tipos celulares, la matriz extracelular representa el soporte sobre el que se presentan moléculas señalizadoras o donde tienen lugar interacciones entre los distintos tipos celulares, incluida la membrana basal. En este modelo las células endoteliales de los vasos y, sobre todo, las células endimarias locales juegan un papel esencial en el proceso de neurogénesis y en la determinación de los linajes de las células producidas.

- 30 En cuanto a la naturaleza de las células madre del sistema nervioso central, algunos autores consideran que las células endimarias multiciliadas son las verdaderas y más primitivas células madre del sistema nervioso central de adultos. Sin embargo, aún hoy en día sigue siendo tema de debate si las células endimarias multiciliadas cuboidales actúan como células madre neurales en determinadas circunstancias.

- 35 Además de las células endimarias, otro tipo celular posee las características propias de células madre del sistema nervioso: los astrocitos subependimarios de los nichos neurogénicos. Tanto las células endimarias como los astrocitos subependimarios de los nichos neurogénicos comparten algunas características: i) derivan de la glía radial presente en etapas fetales y primeras etapas postnatales; ii) son células ciliadas, aunque en el caso de los astrocitos únicamente poseen un único cilio primario localizado en una prolongación apical que contacta con el LCR, y; iii) están en contacto, por tanto, con el LCR y con una membrana basal derivada de los vasos sanguíneos locales.

- 40 Lo que esencialmente está en discusión en la técnica es la capacidad proliferativa de las células endimarias multiciliadas adultas: mientras que para algunos autores estas células se consideran células postmitóticas y diferenciadas, otros han demostrado que pueden adquirir características de glía radial bajo ciertas condiciones y proliferar en respuesta a determinados estímulos, entre ellos a factores de crecimiento, isquemia cerebral y lesiones del tejido nervioso especialmente de la médula espinal.

- 45 En este sentido, células endimarias aisladas mediante anticuerpos contra ciertos marcadores de superficie ("magnetic activated cell sorting") de la médula espinal de ratón han mostrado capacidad proliferativa y de diferenciación in vitro, mientras que las obtenidas de las paredes ventriculares no han manifestado estas propiedades.

- 50 Para estudiar éstos y otros diversos aspectos de la biología celular, el metabolismo, la fisiología y la capacidad de diferenciación de las células endimarias se han utilizado los cultivos de estas células aisladas. Sin embargo, en la mayoría de los casos estos cultivos primarios se obtuvieron utilizando endimocitos procedentes de animales recién nacidos (Weibel et al., 1986. "Primary culture of rat endymal cells in serum-free defined medium". Brain Res 390, 199-

209), y en los casos en los que se usaron células endimarias de animales adultos nunca se consiguieron cultivos puros mediante el uso exclusivo del cultivo de las células (Hirst et al., 2000. "Effect of pneumolysin on rat brain ciliary function: comparison of brain slices with cultured endymal cells". *Pediatr Res.* 47, 381-384; Manthorpe et al., 1977, "Purification of viable ciliated cuboidal endymal cells from rat brain". *Brain Res.* 134, 407-415). El grupo del Prof. van der Kooy llegó a cultivar células endimarias de la pared septal para realizar ensayos de neuroesferas, aunque no del lado estriatal pues se obtenían con células contaminantes del subependimo (Chiasson et al., 1999. "Adult mammalian forebrain endymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics". *J Neurosci.* 19, 4462-4471).

En la técnica actual, los cultivos de células endimarias se obtienen mediante una digestión enzimática de la pared ventricular, de forma que sólo se consiguen poblaciones heterogéneas de células neurales (Monkkonen et al., 2008. "PACAP27 regulates ciliary function in primary cultures of rat brain endymal cells". *Neuropeptides.* 42, 633-640). Por otro lado, muchos de los métodos descritos se refieren a la obtención de cultivos de células madre del sistema nervioso en su sentido más amplio, y no de células endimarias en particular.

La pureza del cultivo es esencial cuando se quieren hacer experimentos en donde se pretende hacer cambiar la potencialidad de la célula. Como se ha mencionado antes las células endimarias pueden participar en fenómenos de regeneración y reparación tisular en el sistema nervioso dañado o en proceso de neurodegeneración, en los que actúan como células madre. Sería imposible obtener resultados fiables de experimentos en los que se partiera de cultivos heterogéneos de células endimarias y otras células neurales.

De forma adicional, en caso de terapias celulares es aconsejable aplicar poblaciones homogéneas de células en las que se ha probado el comportamiento de las mismas.

Dos artículos publicados recientemente (Coskun V. et al., 2008. "CD133+ neural stem cells in the endyma of mammalian postnatal forebrain". *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 1026-1031; Pfenninger et al., 2011. "Prospectively isolated CD133/CD24-positive endymal cells from the adult spinal cord and lateral ventricle wall differ in their long-term in vitro self-renewal and in vivo gene expression". *Glia.* 59, 68-81 2011) y la patente US 20030092176 describen métodos para la obtención de cultivos puros de células endimarias. Sin embargo, los autores tuvieron que clasificar las células utilizando como marcadores anticuerpos fluorescentes ("fluorescent cell sorting"). Este método tiene dos inconvenientes: en primer lugar, es costoso desde el punto de vista económico y complejo en el procedimiento, consumiendo varias horas de trabajo; y en segundo lugar, no existen anticuerpos exclusivos de las células endimarias (Morest and Silver, 2003. "Precursors of neurons, neuroglia, and endymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going?" *Glia.* 43, 6-18) de tal forma que se pueden estar marcando y purificando otros tipos celulares, además del inconveniente adicional de que las células sometidas al reconocimiento inmunológico previo necesario para el "cell sorting" podrían sufrir modificaciones fisiológicas. El método de la presente invención evita estos inconvenientes y presenta por tanto una gran ventaja tecnológica sobre estos procedimientos de la técnica.

La patente US 6,541,247 B1 divulga un método para aislar células madre neurales endimarias del sistema nervioso central que son marcadas in vivo con Dil. El método incluye la necesidad de una purificación por el método de selección magnética o "magnetic sorting". Este método utiliza una partícula magnética para marcar anticuerpos que se unirán a las células endimarias, y reproduce por tanto los inconvenientes señalados del marcaje inmunológico.

De forma similar, la solicitud WO 2004/018655 A2 divulga un método para aislar células madre endimarias de las paredes laterales de los ventrículos laterales y de la médula espinal. Después de sucesivas digestiones y centrifugaciones, las células son resuspendidas en un antisero anti-Notch1 y posteriormente en un medio de cultivo que contiene partículas magnéticas para su separación por medio de un separador magnético. Este procedimiento repite inconvenientes similares a la referencia anterior y tampoco debe afectar a la patentabilidad de la invención.

El problema entonces de la técnica es disponer de un procedimiento de obtención de cultivos puros de células endimarias, en el que no existan células contaminantes de ningún otro tipo, que asegure la homogeneidad de los resultados obtenidos en los cultivos celulares. La solución que propone la presente invención es la obtención de dicho cultivo puro por un método que incluye como etapas determinantes una incubación del tejido en frío previa a la digestión proteolítica a temperatura corporal, y el mantenimiento posterior del cultivo en un medio básico donde no sobrevive ninguna célula neural con excepción de dichas células endimarias.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un procedimiento de obtención de un cultivo puro de células endimarias multiciliadas, que comprende:

- incubación en frío de un explante de pared ventricular de cerebro o del canal central de la médula espinal de un sujeto preferiblemente durante al menos 10 min;

- digestión enzimática de dicho explante en presencia de al menos una enzima proteolítica, preferiblemente un cóctel de enzimas proteolíticas, y un quelante de calcio preferiblemente durante al menos 20 min;
 - lavado del explante resultado de dicha digestión con un medio de cultivo celular, preferiblemente un medio básico de cultivo celular y más preferiblemente α MEM-Glucosa; y
- 5 - purificación de las células endimarias desprendidas al medio resultado de la etapa anterior en medio básico de cultivo celular preferiblemente α MEM-Glucosa. En una realización preferible, esta purificación se lleva a cabo durante 24 h, más preferiblemente durante al menos 36 h y más preferiblemente aún durante al menos 48 h. En otra realización preferible de la invención, el medio básico de cultivo celular comprende un surfactante no iónico.
- 10 La realización más preferible de la invención es que el procedimiento comprenda una incubación del explante una vez lavado en presencia de al menos una enzima capaz de digerir DNA, preferiblemente DNasa I o DNasa II. Tras la correspondiente eliminación de la enzima y recuperación de las células endimarias, la cantidad obtenida al purificarlas se incrementa en cerca de dos órdenes de magnitud.
- 15 Otra realización del procedimiento de la invención es que dicha enzima proteolítica y dicho quelante de calcio que se utilizan en la digestión se adicionen en la incubación en frío de la etapa anterior. Sin embargo, el resultado de esta realización no mejora significativamente la cantidad final de células purificadas.
- El alcance de la presente invención refiere siempre a células endimarias multiciliadas, y a ellas se referirá cuando haga mención a "células endimarias".
- 20 En el ámbito de la presente invención se entiende por "cultivo puro" de células endimarias un cultivo de dichas células endimarias esencialmente del 100% de pureza, y la ausencia de cualquier otro tipo de células del parénquima.
- En el ámbito de la presente invención se entiende por una "incubación en frío" una incubación entre 0 y 6°C, típicamente a 4°C en baño de hielo.
- 25 En el ámbito de la presente invención se entiende por un "quelante de calcio" aquel compuesto capaz de separar el calcio de la superficie celular o de inhabilitarlo en su función, típicamente reaccionando de forma química con él. Varias sustancias pueden actuar como quelantes de calcio en cultivos celulares, por ejemplo y sin intención de resultar restrictivos, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), el EGTA (etilenglicol-bis-(β -aminoetil)-N,N,N',N'-ácido tetraacético), y el BAPTA (ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético).
- 30 El procedimiento de la invención resulta mucho más sencillo que los descritos en la técnica, además de su alto rendimiento. Un aspecto determinante de su inventividad es la primera etapa de incubación en frío que aumenta enormemente el rendimiento del número de células endimarias a obtener y, mas importante aún, evita el marcaje con anticuerpos con todas las ventajas que esto conlleva, desarrolladas en el capítulo anterior.
- 35 Por otra parte, está ampliamente aceptado que las células del sistema nervioso necesitan factores de crecimiento para su supervivencia en cultivos celulares. Sin embargo, los inventores han descubierto que sorprendentemente las células endimarias aisladas in vitro no necesitan de tales factores para mantenerse, lo cual es excepcional con respecto al resto de células neurales. Así, las células endimarias pueden sobrevivir en medio de cultivo simple α MEM-glucosa sin suplementar con factores de crecimiento por un periodo de hasta 2 semanas mientras que el resto de las células neurales mueren, lo cual supone un segundo aspecto determinante de la inventividad del procedimiento de la invención.
- 40 La mayoría de las células en cultivo producen factores de crecimiento que son liberados al medio. Las células cultivadas a una cierta densidad generan una concentración de factores que podría potenciar la supervivencia de células neurales. De forma coherente con este hecho, el alcance de la presente invención comprende la aplicación de cualquier método que evite la presencia de factores de crecimiento en el medio básico utilizado en la etapa final de purificación de las células endimarias. Entre ellos, un método sencillo es cultivar las células a baja densidad según el procedimiento ejemplificado en la presente solicitud.
- 45 Una realización preferible de la invención, por tanto, es que la purificación de la etapa d) se lleve a cabo a una baja densidad celular, preferiblemente inferior a 2 células/ microlitro y más preferiblemente de 1 célula/microlitro.
- Otra realización preferible del procedimiento de la invención es que el sujeto de quien procede el explante es un vertebrado, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un roedor.
- Otra realización muy preferible de la invención es el cultivo puro de células endimarias. Y otra realización preferible más es el uso de dicho cultivo puro de células endimarias en biomedicina o farmacología.
- 50 La posibilidad de tener un cultivo puro de células endimarias servirá para abordar el estudio de estas células in vitro, con la posibilidad de controlar un gran número de parámetros que no pueden ser manipulados in vivo. Los

conocimientos de la biología celular y especialmente de la fisiología de las células endimarias son muy limitados, entre otras razones por la imposibilidad de tener cultivos celulares puros de las células procedentes de adultos. El estudio de las células endimarias in vitro posibilitaría evaluar el potencial de dichas células para cambiar su fenotipo y transformarse en células con características de glía radial o de astrocito, fenómeno que ocurre de forma natural en situaciones de lesión del sistema nervioso.

Por otro lado, en humanos, varios tipos celulares poseen cilios: el epitelio de las vías respiratorias superiores e inferiores, el epitelio de los oviductos y de los conductos espermáticos, el órgano de Corti en el oído interno y las células endimarias del sistema nervioso central. Un cierto número de patologías denominadas ciliopatías afectan a estos sistemas y tienen su etiología en una disfunción del aparato ciliar de las células ciliadas. Disponer de un tipo celular multiciliado que se pueda cultivar in vitro permitiría abordar el estudio de los cilios móviles (9+2) presentes en las células ciliadas. Los cultivos puros de células endimarias pueden constituir un modelo de estudio de las mencionadas ciliopatías.

Por otra parte, algunos fármacos interactúan de forma indeseable con el funcionamiento del aparato ciliar, lo cual conlleva consecuencias muy graves. Disponer de un modelo in vitro de célula ciliada en donde poder probar la acción de nuevos fármacos será de gran interés para la industria farmacéutica. En concreto para investigar la acción de nuevos drogas terapéuticas sobre el funcionamiento del aparato ciliar.

Teniendo en cuenta los importantes avances que se están produciendo en el campo de la inducción de células madre pluripotenciales, el posible cambio de potencialidad de las células endimarias bajo condiciones controladas apunta a la utilidad de los cultivos puros primarios de células endimarias para su aplicación en experimentos dirigidos a futuras terapias para la reparación del sistema nervioso, especialmente en situaciones de envejecimiento, donde el número de células madre neurales convencionales disminuye de forma significativa. El estudio de las células endimarias en modelos in vitro podrá aportar nueva información sobre los factores que pudieran desencadenar la transformación de células endimarias en células madre neurales.

Disponer de un cultivo puro de células endimarias permitirá desarrollar modelos de transformación de este tipo celular en células con características tumorales, y en concreto en endimomas. Los endimomas son tumores que se desarrollan a partir de las células endimarias y que suponen un 9% de los tumores cerebrales. El hecho de disponer de un modelo in vitro de células endimarias permitirá también estudiar la fisiología de dichas células desde un punto de vista general.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Disección del cerebro de la rata para la obtención de los explantes de pared ventricular. **A:** Vista ventral del cerebro de la rata adulta. La línea discontinua marca el nivel por el que se realiza el corte transversal del cerebro. Este plano de corte pasa por el quiasma óptico (flecha). Las letras "r" y "c" significan rostral y caudal respectivamente. **B:** Imagen del plano de corte indicado en A (fragmento rostral). Las líneas punteadas indican los lugares de corte para obtener la imagen en C. Las letras "d" y "v" significan dorsal y ventral respectivamente. **C:** El mismo fragmento que en B con los cortes a nivel dorsal (telencéfalo) y ventral. **D:** Imagen de la región dorsal del fragmento mostrado en C. A través del corte realizado se puede observar parte de la pared ventricular estriatal. **E:** Este fragmento lateral que se observa en esta imagen se ha obtenido cortando por la parte rostral y ventral el fragmento observado en D. En dicho fragmento están marcados con línea discontinua los límites por donde se corta para obtener un explante de la pared estriatal. **F:** Explante de la pared estriatal obtenido del fragmento mostrado en la figura E. Barras en A, B, C, D y E, 500 µm; Barra en F, 100 µm.

Figura 2. Explante de pared ventricular de rata en cultivo después del tratamiento enzimático y células endimarias desprendidas del mismo. **A:** Fragmento de explante de la pared estriatal del ventrículo lateral inmediatamente después del tratamiento enzimático. Se pueden apreciar varios grupos de células parcialmente separadas del explante (flechas). A partir de estos grupos se irán desprendiendo células endimarias individuales. **B:** Células desprendidas de un explante in vitro 24 horas después del tratamiento enzimático. La mayor parte de las células tienen una morfología esférica y están en movimiento. **C:** Células endimarias in vitro 72 horas después del tratamiento enzimático y 48 horas después de permanecer en un medio mínimo a baja densidad. Las únicas células vivas están en movimiento rotatorio. **D:** Células similares a las mostradas en la imagen C pero a mayores aumentos. Barra en A, 100 µm; barras en B y C, 40 µm; barra en D, 20 µm.

Figura 3. Frotis de células endimarias de ratón (72 horas en cultivo) fijadas e inmunoteñidas con distintos marcadores. **A y B:** Células endimarias marcadas con un anticuerpo contra la beta-IV-tubulina. Este marcador se localiza tanto en el cuerpo celular como en los cilios. **C y D:** Células endimarias inmunoteñidas con anti-tubulina acetilada. El patrón de tinción es similar al de la beta-IV-tubulina. **E y F:** Tinción de endimocitos con beta-III-tubulina. En este caso las células endimarias no se tiñeron con este anticuerpo, que es un marcador de neuroblastos. **G y H:** Tinción con anticuerpos contra la gamma-tubulina. Este marcador se localiza en los centriolos y, por tanto, en los cuerpos basales de los cilios. Como se puede apreciar en la imagen a mayores aumentos la marca se localiza en la base de los cilios. Barras en A, C, E y G, 20 µm; barras en B, D, F y H, 10 µm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Separación de las células endimarias de los explantes

- 5 Se utilizaron explantes de 2,5 mm² de la pared estriatal y septal de los ventrículos laterales del cerebro de ratas adultas (Wistar, peso de 250-300 g) y de ratones adultos (Cepa CD1, peso de 20-25 g). Se situaron los explantes tanto de rata como de ratón en tubos de ensayo tipo Falcon de 15 ml con un volumen de HBSS de 2 ml por explante, a 4°C durante 10 minutos. Después de ese tiempo se llevó a cabo una digestión enzimática muy suave con solución enzimática TrypLE™ Express (Invitrogen, ref. 12605-010), a razón de 2 ml por explante. Esta solución enzimática está formada por
- 10 una enzima recombinante obtenida mediante fermentación bacteriana y un quelante de calcio (EDTA 1 mM). La incubación con la solución enzimática se realizó en un tubo Falcon de 15 ml, a 37° C sin agitación y durante 20 minutos. Se retiró entonces la solución enzimática, se le añadió medio de cultivo α -MEM (Invitrogen ref. A10490-01) y se dejó en baño de hielo durante otros 5 minutos. Luego se sustituyó el medio frío por α -MEM a temperatura ambiente en el que permanecieron los explantes durante 5 minutos más. A continuación se situaron en placas de 6 pocillos (superficie del pocillo 962 mm²), en cada uno de los cuales se suplementaron 3 ml de α -MEM con los siguientes aditivos: glucosa al 0,3% y Pluronic F-127 al 0,2% (Sigma ref. P-2443). Después de 24 horas en este medio, el resultado fue el desprendimiento de muy pocas células endimarias, que se cuantificaron en $2,3 \times 10^2$ células por explante de pared estriatal y $1,8 \times 10^2$ por explante de pared septal.

Ejemplo 2: Separación de las células endimarias de los explantes y digestión posterior con DNasa

- 20 Se utilizaron explantes de 2,5 mm² de la pared estriatal y septal de los ventrículos laterales del cerebro de ratas adultas (Wistar, peso de 250-300 g) y de ratones adultos (Cepa CD1, peso de 20-25 g). Estos explantes se situaron en tubos de ensayo tipo Falcon de 15 ml con un volumen de HBSS de 2 ml por explante, a 4°C durante 10 minutos. Después de ese tiempo se llevó a cabo una digestión enzimática muy suave con solución enzimática TrypLE™ Express (Invitrogen, ref. 12605-010), a razón de 2 ml por explante. La incubación con la solución enzimática se realizó en un tubo Falcon de 15
- 25 ml, a 37° C sin agitación y durante 20 minutos. Se retiró entonces la solución enzimática, se le añadió medio de cultivo α -MEM (Invitrogen ref. A10490-01) y se dejó en baño de hielo durante otros 5 minutos. Luego se sustituyó el medio frío por α -MEM a temperatura ambiente en el que permanecieron los explantes durante 5 minutos más. A continuación se situaron en placas de 6 pocillos (superficie del pocillo 962 mm²), en cada uno de los cuales se suplementaron 3 ml de α -MEM con los siguientes aditivos: glucosa al 0,3% y Pluronic F-127 al 0,2% (Sigma ref. P-2443), Dnasa I al 0,01% (Sigma ref. DN-25). Se incubaron entonces 24 horas en una estufa a 37° C en atmósfera del 5% de CO₂ para conseguir desprender la mayoría de las células endimarias y muy pocas células de cualquier otro tipo (Figura 2b). Tras las 24 horas de cultivo del explante la mayor parte de las células endimarias se desprenden y quedan en el fondo de las placas de cultivo. Para recoger estas células se dejó decantar el medio de cultivo durante 10 minutos quedando las células endimarias en suspensión. El sobrenadante se centrifugó entonces a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de medio nuevo sin DNasa (α -MEM con 0,3% glucosa, 0,2% Pluronic F-127) para
- 35 hacer un recuento celular mediante una cámara cuenta glóbulos, donde se estimó que de cada explante estriatal se obtuvieron 15×10^3 células endimarias en movimiento, mientras que de un explante de la pared septal, 12×10^3 .

Ejemplo 3: Caracterización citológica de las células obtenidas

- 40 El pellet del cultivo de células endimarias obtenido en el Ejemplo 2 se resuspendió en 1 ml de medio y se fijó con formaldehído a una concentración final del 2%, durante 20 minutos a 4°C. Con este material se realizaron extensiones celulares sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma, ref. P-8920) y se sometieron a inmunocitoquímica para determinar la identidad de las células desprendidas. Se utilizaron entonces anticuerpos marcadores de: i) astrocitos y células astrogiales (anti-GFAP, Sigma G3893, G9269, dilución 1:1000; anti-GLAST, Abcam dilución 1:1000); ii) neuroblastos (anti-beta-III-tubulina, Promega G7121, dilución 1:5000); iii) células ciliadas (anti-gamma tubulina, Sigma T5192, dilución 1:1000, anti-tubulina acetilada Sigma 6793, dilución 1:1000 y anti-beta-IV-tubulina, Sigma T7941, dilución 1:1000); iv) oligodendrocitos (anti-SOX10, R&D Systems, ref. MAB2864, dilución 1:100; y anti-olig2, R&D Systems, ref. AF2418, dilución 1:100); v) microglía (anti-IBA1, Wako 19-19741, 1:1000). La técnica inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos secundarios marcados con biotina (anti-IgG de conejo, Pierce, ref. 31820 y anti-IgG de ratón, Pierce ref. 31800) a una dilución de 1:1000. Posteriormente las células se incubaron con el complejo avidina-biotina (Thermo-Scientific, ABC Peroxidase Staining Kit, ref. 32020) a una dilución de 1:250 siguiendo las instrucciones del fabricante. El revelado de la peroxidasa se realizó con diaminobencidina y perhidrol. Todos los lavados se realizaron con tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS). Mediante la inmunotinción de las extensiones celulares con los distintos marcadores de células neurales se llegó a determinar que un 7% de las células desprendidas no eran células endimarias.

55

Ejemplo 4: Purificación de las células endodimarias en cultivo

Las células endodimarias obtenidas según el Ejemplo 2 se volvieron a poner en cultivo en el mismo medio pero en un volumen de 15 ml en una placa de Petri de 90 mm de diámetro (63,61 cm²). Se mantuvieron en dicha placa con medio α MEM suplementado con 0,3% glucosa durante un periodo de 48 horas para obtener una densidad de cultivo entre 1-2 células por microlitro; en estas condiciones sólo son capaces de sobrevivir las células endodimarias, mientras que las pocas células no endodimarias desprendidas debido a la digestión mueren al cabo de este tiempo (figura 2C y D). Para verificar este hecho, tras 48 horas se analizaron los cultivos de la siguiente forma: los 15 ml de medio se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio α MEM. Estas células se fijaron mediante la adición de 1 ml de formaldehído al 4%, durante 20 minutos a 4°C. Las células fijadas se caracterizaron citológicamente según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. Tras 48 horas en cultivo el 100% de las 2093 células fueron positivas a los marcadores endodimarios (figura 3) y además todas presentaban el penacho de cilios característico. Para separar las células endodimarias de las células muertas se centrifugó el medio de cultivo a 750 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante con la totalidad de las células muertas y restos celulares.

Ejemplo 5: Esquema de la mejor realización del método de la invención

Disección del cerebro de la rata/ratón: exposición de las paredes de los ventrículos laterales



Obtención de explantes de la pared ventricular de rata/ratón



t=0

Incubación secuencial de los explantes en:

- Medio HBSS a 4° C, 10 minutos
- TripLe™ Express (Invitrogen) a 37° C, 20 minutos
- MEM (Invitrogen) a 4° C, 5 minutos
- MEM (Invitrogen) a 20° C, 5 minutos



Incubación de los explantes en MEM conteniendo los aditivos:

- 0,3% glucosa,
- 0,2% Pluronic F127 y
- 0,01% DNasa I

Incubación a 37° C con 5% de CO₂ en placas de 6 pocillos, 3 ml de medio por pocillo.



En las primeras horas se fueron desprendiendo las células ependimarias de los explantes



t=24h

Tras 24 horas de incubación se obtuvieron un gran número de células, la mayoría son ependimarias (7% no ependimarias)



Estas células se diluyeron a una densidad de 1 célula/microlitro y se incubaron 48 horas en MEM con 0,3% glucosa y 0,2% Pluronic F127 a 37° C con 5% de CO₂



Se fijaron en formol al 2%, se realizó frotis e inmunocitoquímica con distintos marcadores



En estas condiciones y durante este tiempo sólo sobrevivieron las células ependimarias

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un cultivo puro de células endimarias multiciliadas, que comprende:
 - a) incubación en frío de un explante de pared ventricular de cerebro o del canal central de la médula espinal de un sujeto,
 - 5 b) digestión enzimática de dicho explante en presencia de al menos una enzima proteolítica y un quelante de calcio,
 - c) lavado del explante resultado de la digestión de la etapa b) con un medio de cultivo celular, y
 - d) purificación de las células endimarias desprendidas al medio resultado de la etapa anterior, en medio básico de cultivo celular.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende una incubación del explante resultado de la etapa c) en presencia de al menos una enzima capaz de digerir DNA.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en que dicha enzima capaz de digerir DNA es la DNAsa I.
4. Un procedimiento según la reivindicación 2, en que dicha enzima capaz de digerir DNA es la DNAsa II.
- 15 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que dicha enzima proteolítica y dicho quelante de calcio de la etapa b) se adicionan en la etapa a).
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dicha digestión enzimática de la etapa b) se realiza en presencia de un cóctel de enzimas proteolíticas y al menos un quelante de calcio.
7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en que dicha incubación en frío de la etapa a) se realiza al menos durante 10 min.
- 20 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que dicha digestión enzimática de la etapa b) se realiza al menos durante 20 min.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en que dicho medio de cultivo celular de la etapa c) es un medio básico.
- 25 10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en que dicha purificación de la etapa d) comprende el mantenimiento de las células endimarias en dicho medio básico durante 48 h.
11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en que dicho medio básico de cultivo celular es α MEM-Glucosa.
12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en que dicho medio básico de cultivo celular de la etapa d) comprende un surfactante no iónico.
- 30 13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en que dicha purificación de la etapa d) se realiza a una densidad celular inferior a 2 células/microlitro.
14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho sujeto es un vertebrado.
15. Un procedimiento según la reivindicación 14, en que dicho vertebrado es un mamífero.
16. Un procedimiento según la reivindicación 15, en que dicho mamífero es un roedor.
- 35 17. Cultivo puro de células endimarias.
18. Uso de un cultivo según la reivindicación 17 en biomedicina.
19. Uso de un cultivo según la reivindicación 17 en farmacología.

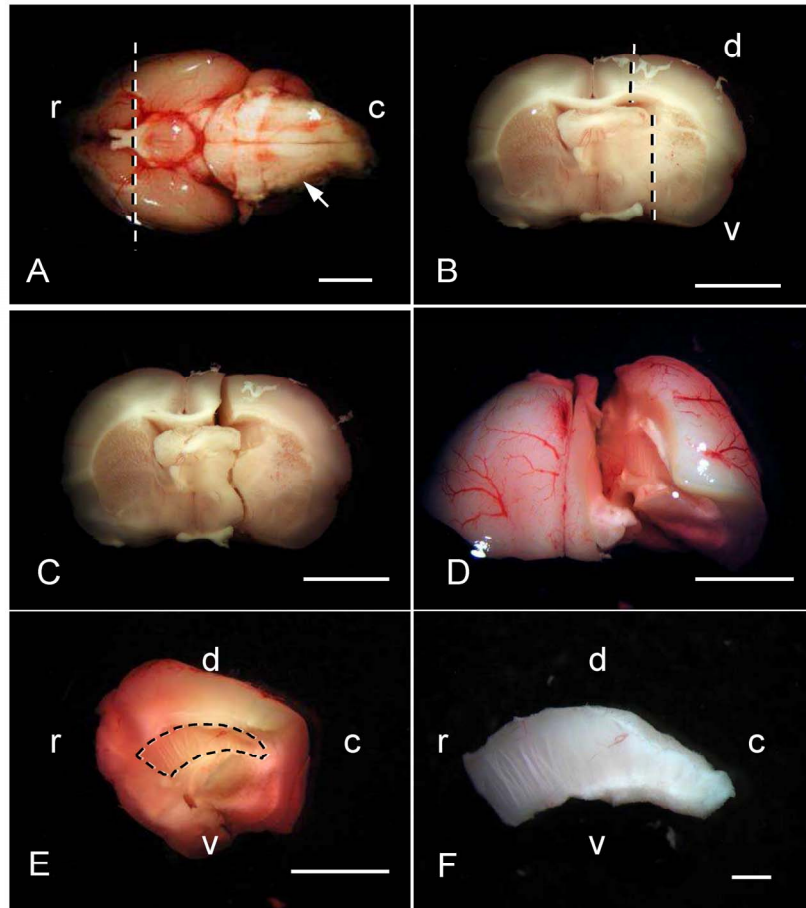


Fig. 1

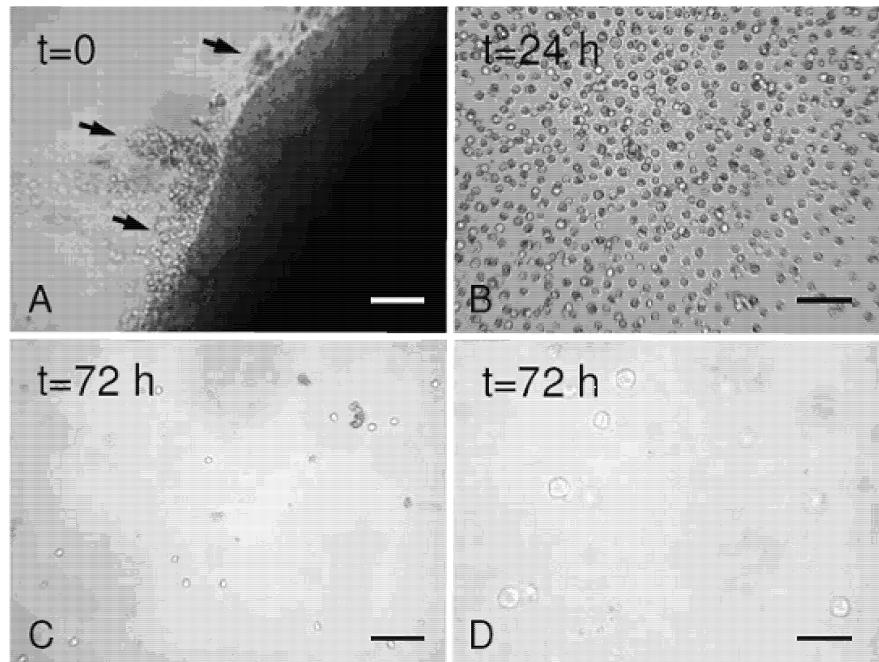


Fig. 2

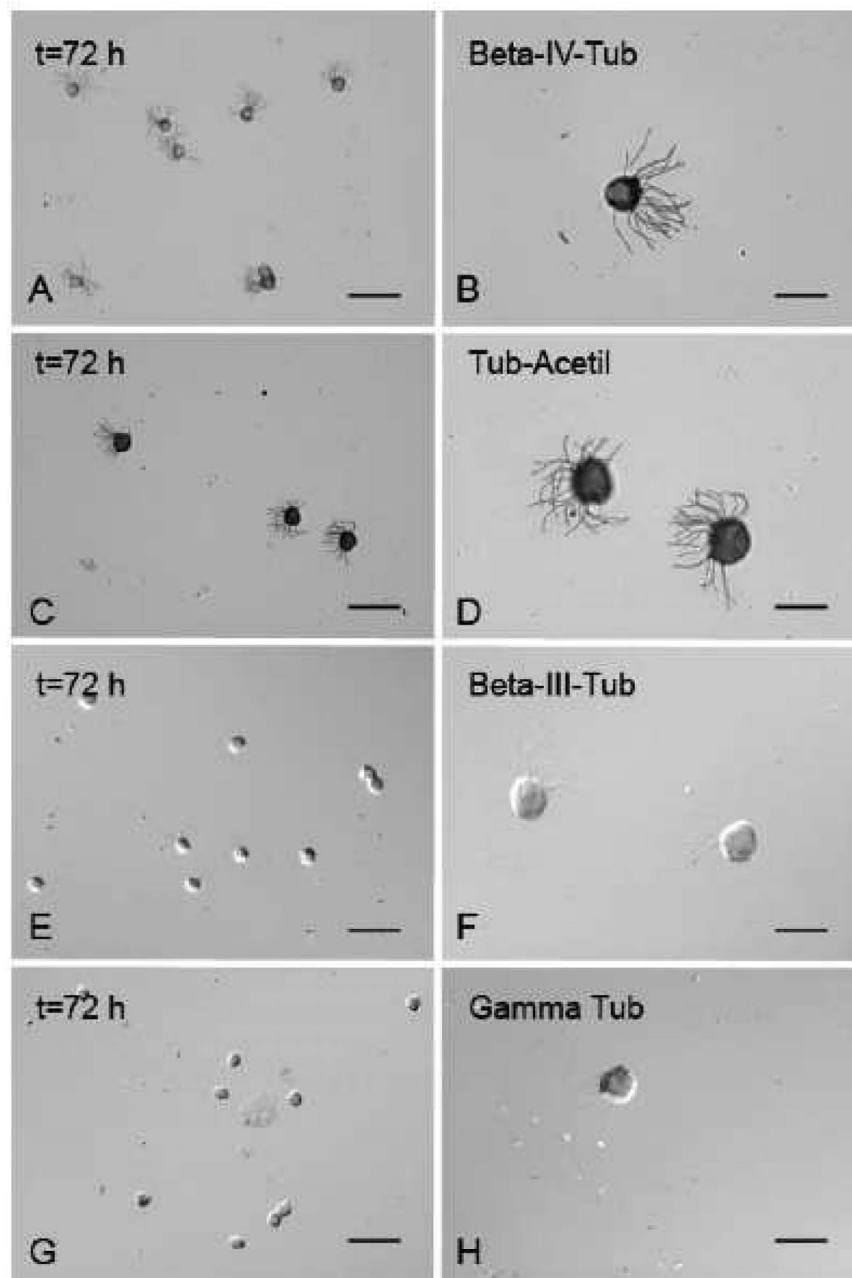


Fig. 3



- ②① N.º solicitud: 201131556
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.09.2011
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/079** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 7320872 B2 (JANSON ANN MARIE et al.) 22.01.2008, todo el documento, especialmente columna 5, líneas 14-16; columna 7, líneas 16-22; columna 8, líneas 10-53; columna 16, líneas 23-34.	17-19
A		1-16
X	CHIASOON B J et al. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 01.06.1999. VOL: 19 No: 11 Pags: 4462 - 4471 ISSN 1529-2401 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente páginas 4463 y 4465.	1,5-19
Y		2-4
X	WO 2010062905 A2 (UNIV CALIFORNIA et al.) 03.06.2010, todo el documento, especialmente párrafo [0190]; reivindicaciones.	17-19
Y		2-4
A		1,5-16
X	NGUYEN T et al. Intracellular pathways regulating ciliary beating of rat brain ependymal cells. The Journal of physiology 15.02.2001 VOL: 531 No: Pt 1 Pags: 131-140 ISSN 0022-3751 (Impreso) Doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0131j.x. Ver apartado "Métodos" (Página 132).	1,5-12,14-19
A		13
A	PFENNINGER COSIMA V et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. Cancer research. 15.06.2007 VOL: 67 No: 12 Pags: 5727-5736 ISSN 0008-5472 (Impreso). Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0183. Ver resumen y apartado "Materiales y métodos".	1-19

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
25.01.2013

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

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

C12N

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

EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, TCPAT, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.01.2013

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-16
Reivindicaciones 17-19

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-19

SI
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	US 7320872 B2 (JANSON ANN MARIE et al.)	22.01.2008
D02	CHIASSEON B J <i>et al.</i> The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 01.06.1999. VOL: 19 No: 11 Pags: 4462 - 4471 ISSN 1529-2401 (Electrónico).	01.06.1999
D03	WO 2010062905 A2 (UNIV CALIFORNIA et al.)	03.06.2010
D04	NGUYEN T <i>et al.</i> The Journal of physiology 15.02.2001 VOL: 531 No: Pt 1 Pags: 131-140 ISSN 0022-3751 (Impreso) Doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0131j.x.	15.02.2001
D05	PFENNINGER COSIMA V <i>et al.</i> Cancer research. 15.06.2007 VOL: 67 No: 12 Pags: 5727-5736 ISSN 0008-5472 (Impreso). Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0183.	15.06.2007

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 cultivo puro de células endimarias multiciliadas, que comprende la incubación de un explante de pared ventricular de cerebro o del canal ventral de la médula espinal, la digestión enzimática del explante con enzimas proteolíticas y un quelante de calcio, el lavado del explante y el cultivo de las células obtenidas en un medio básico de cultivo celular. El procedimiento puede incluir también una incubación con DNasa. La solicitud reivindica también un cultivo puro de células endimarias, y el uso del mismo en biomedicina y farmacología.

El documento D01 describe el aislamiento de células endimarias y la obtención de un cultivo puro de estas células (ver columna 16, líneas 23 a 34), además de los usos del mismo como medicamento y composición farmacéutica (ver columna 8, líneas 10 a 53). Por tanto, el documento D01 afecta la novedad de las reivindicaciones 17 a 19 de la presente solicitud según el artículo 6 de la Ley de Patentes. Dado que las células en D01 se obtienen mediante un procedimiento distinto del reivindicado en la solicitud, este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 16 de la solicitud.

En el documento D02 también se aíslan células endimarias de cerebro de ratón, y se obtiene un cultivo puro de las mismas. Por tanto, este documento afecta la novedad de la reivindicación 17 de la presente solicitud, según el artículo 6 de la Ley de Patentes. Aunque en D02 no se menciona el uso de las células, su utilización en biomedicina y farmacología es evidente para el experto en la materia, por lo que este documento afecta también la actividad inventiva de las reivindicaciones 18 y 19 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el procedimiento del documento D02, se cortan secciones de cerebro en frío, se digieren con una mezcla enzimática, se lavan y se cultivan, a una concentración celular muy baja, en medio básico sin factores de crecimiento. Por tanto, se trata de un procedimiento muy semejante al reivindicado en la solicitud, lo que supone que el documento D02 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 y 5 a 16 de la solicitud, ya que los tiempos exactos de cada una de las etapas no aportan actividad inventiva a la misma, y el uso de un quelante de calcio y un surfactante son ampliamente conocidos en el estado de la técnica de los cultivos celulares. La diferencia más importante entre la solicitud y el documento D02 es la incubación adicional con DNasa, si bien se trata de un tratamiento común en este campo técnico, como se puede apreciar, por ejemplo, en el documento D03.

El citado documento D03 describe también el aislamiento y cultivo de células endimarias de la pared ventricular de cerebro de ratón mediante un proceso que comprende la incubación de las muestras en una mezcla enzimática que incluye tripsina-EDTA y DNasa (ver el párrafo [0190], en el ejemplo 3 del documento). Por tanto, la evidente combinación de los documentos D02 y D03 por parte del experto en la materia, llevaría a éste, sin realizar ningún esfuerzo inventivo, al procedimiento de la invención. Por consiguiente, las reivindicaciones 2 a 4 de la presente solicitud no cumplen el requisito de actividad inventiva a la luz de la información divulgada en los documentos D02 y D03 según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Por otro lado, ya que en D03 se obtienen cultivos puros de células endimarias, y se reivindica su uso médico y farmacéutico, este documento afecta también la novedad de las reivindicaciones 17 a 19 de la solicitud según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

El procedimiento de aislamiento de células endimarias de cerebro de rata descrito en el documento D04 incluye, como el de la solicitud, la incubación de los cortes de cerebro en medio frío, su digestión con una mezcla de enzimas proteolíticas, el lavado posterior y el cultivo de las células en un medio básico de cultivo celular sin factores de crecimiento. De este modo, se obtienen cultivos puros de células endimarias. El documento D04 anticipa, por ello, la novedad de la reivindicación 17 de la solicitud según el artículo 6 de la Ley de Patentes, y la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 5 a 12, 14 a 16, 18 y 19 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Finalmente, se cita el documento D05, que, si bien no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, sirve como ejemplo de documento del estado de la técnica en el que se divulga un procedimiento de obtención de células endimarias en el que se añade un quelante de calcio (EDTA) en el paso de tratamiento enzimático de la muestra.