



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 321 370**

② Número de solicitud: 200702012

⑤ Int. Cl.:
C12N 5/0793 (2010.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **19.07.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2009**

Fecha de la concesión: **22.02.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **05.03.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
05.03.2010

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Bartolomé Pascual, María Visitación**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas del ganglio espiral.**

㉒ Resumen:

Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas del ganglio espiral.

La presente invención se refiere a un método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas del ganglio espiral que incluye tanto una disociación mecánica como una enzimática con tripsina a 37°C, la adhesión de los explantes a superficies cargadas positivamente y un medio de cultivo acondicionado que incorpora suero de caballo, L-glutamina, los suplementos B27 y N2 simultáneamente y el factor de crecimiento GAP-43. La invención se puede aplicar en medicina regenerativa para solucionar problemas relacionados con hipoacusias y diferentes sorderas neurosensoriales incluida la presbiacusia.

ES 2 321 370 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas del ganglio espiral.

5 Objeto de la invención

La presente invención según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a un método específico para regenerar neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas del ganglio espiral en condiciones *in vitro*.

10 Esta invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina y, más concretamente, dentro de la medicina regenerativa del sistema auditivo.

Estado de la técnica

15 *Alteraciones en el receptor auditivo*

La presbiacusia se define como la pérdida de audición progresiva y bilateral, generalmente simétrica, relacionada directamente con el envejecimiento del sistema auditivo.

20 La pérdida progresiva de la audición no es una alteración única, existen al menos cuatro tipos diferentes de presbiacusia:

- a. presbiacusia sensorial: atrofia y degeneración de las células ciliadas.
- 25 b. presbiacusia neurosensorial: degeneración de las neuronas del ganglio espiral. Afectación de la inteligibilidad del lenguaje.
- c. presbiacusia metabólica: alteración de la secreción y composición de la endolinfa. Pérdida global de audición.
- 30 d. presbiacusia mecánica o de conducción: alteración de los sistemas mecánicos de transducción de la onda sonora.

35 La presbiacusia neurosensorial en el ser humano conlleva no sólo una incapacidad de comprensión e interpretación de los sonidos agudos sino también una importante alteración en la percepción e interpretación de los sonidos de frecuencias medias para la discriminación del habla, teniendo en cuenta que en individuos normooyentes el área de conversación se encuentra en las frecuencias medias (alrededor de 60 decibelios). Ésta pérdida de audición está estrechamente relacionada con el procesado, interpretación y transmisión del lenguaje, interactuando de forma impredecible, con alteraciones de personalidad, de motivación, de inhabilidades concretas, de aislamiento social y por tanto generando condicionantes desfavorables a nivel social y familiar.

40 Desde el punto de vista epidemiológico la presbiacusia es la segunda patología del anciano con mayor prevalencia, después de la artritis. Las afecciones del oído ocupan el tercer lugar en frecuencia, mientras que las afecciones relacionadas con la visión se sitúan en novena posición. Las estadísticas sobre la población con problemas auditivos en general no son nunca reales y siempre tienden a ser porcentajes muy inferiores, ya que en general las personas con deficiencias auditivas son reticentes a admitir que tiene este tipo de dificultad. Estudios realizados en 1994 sobre las situaciones crónicas de la vejez en USA pusieron de manifiesto que 4 de cada 5 individuos presentaban una audición deficiente. El envejecimiento de la población española es muy rápido, en estos últimos treinta años, se ha duplicado el número de personas mayores, representando este grupo social el 16,8% del total de la población nacional. En consecuencia, la presbiacusia en la sociedad española empieza a ser una de las causas más frecuentes en la consulta de Otorrinolaringología.

45 La presbiacusia se incluye dentro del amplio grupo de patologías de tipo degenerativo que se originan durante el envejecimiento natural o fisiológico del organismo. Una de las causas principales de la presbiacusia es la pérdida de las neuronas del ganglio espiral. Las razones por las que estas neuronas degeneran con la edad son aún desconocidas.

50 El sistema sensorial para la recepción e interpretación del sonido está subdividido en dos partes: la cóclea y la vía auditiva. La onda sonora captada por el oído externo y transportada al oído medio alcanza la cóclea, donde esta onda sonora, a través del sistema sensorial, transforma la onda sonora en un mensaje neurosensorial. Este mensaje neurosensorial, conducido a través de la vía auditiva, es analizado e interpretado en la corteza auditiva. La vía auditiva está formada por diferentes núcleos ubicados en protuberancia (núcleos cocleares, complejo olivar superior), mesencéfalo (lemnisco y colículo inferior), diencefalo (cuerpo geniculado medial) y corteza auditiva. Estos núcleos conectados entre sí generan un complejo sistema de comunicación entre el receptor periférico y la corteza auditiva.

65 La cóclea se encuentra alojada dentro del peñasco del hueso temporal, el receptor periférico y el ganglio espiral se disponen alrededor del hueso modiol o columela, lo que dificulta considerablemente el estudio de esta estructura en el animal adulto. La cóclea o caracol es una estructura helicoidal formada por el sistema receptor periférico y el ganglio espiral. El receptor periférico está constituido por diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran las

ES 2 321 370 B1

células sensoriales denominadas células ciliadas externas e internas. Son estas células sensoriales las que contactan con las neuronas del ganglio espiral que a su vez envían el mensaje a la vía auditiva.

5 *El modelo experimental en el estudio del envejecimiento del receptor auditivo*

El receptor auditivo es una estructura muy sensible a la hipoxia, bastan escasos minutos para que degeneren la estructura una vez aislada del individuo. Esta propiedad hace que los resultados de regeneración obtenidos con humanos sean escasos debido a la gran dificultad que supone trabajar con cócleas procedentes de biopsias y/o autopsias.

10

El estudio del envejecimiento del receptor auditivo requiere un animal de experimentación adecuado, en el que las alteraciones estructurales y funcionales observadas en relación con la edad sean concluyentes en el hombre. La anatomía y fisiología del oído presentan muchas similitudes entre las distintas especies de mamíferos, más concretamente las características morfofuncionales entre el oído de ratón y humano son muy similares. En la actualidad se utiliza muy frecuentemente para estudios de envejecimiento del receptor auditivo la cepa de ratón C57BL/6J por presentar un envejecimiento neurosensorial precoz de manera que, a los doce meses de vida, este ratón ya presenta signos de alteraciones morfológicas y fisiológicas relacionadas con la sordera. Estas alteraciones son muy similares a las observadas en humanos.

15

20

En el análisis de las cócleas procedentes de cualquier modelo de sordera experimental, incluyendo el envejecimiento prematuro del receptor auditivo (presbiacusia), siempre se ha observado el mismo patrón degenerativo. Las primeras células que se alteran y desaparecen son las células de Hensen, posteriormente las células ciliadas externas desaparecen. La degeneración y desaparición del túnel de Corti y las células ciliadas internas preceden a la degeneración y muerte de neuronas en el ganglio espiral.

25

Se han generado experimentalmente patologías auditivas en roedores (ratas y ratones) utilizando diferentes procedimientos como:

30

1. Sorderas genéticas por alteraciones de genes o proteínas en ratones transgénicos.
2. Sorderas por inducción de hipotiroidismo experimental.
3. Sorderas ototóxicas por tratamiento con drogas o antibióticos.
4. Sorderas por trauma acústico sometiendo los animales durante horas a ruido con alta intensidad.
5. Presbiacusia neurosensorial en diferentes mamíferos incluido el hombre.

35

40

En todas las sorderas neurosensoriales, patologías experimentales y biopsias humanas analizadas siempre se observa que el complejo sistema de células sensoriales y células de soporte que conforman el receptor auditivo es sustituido por un epitelio cicatricial, unicelular plano y no funcional. A nivel de ganglio espiral un cierto número de neuronas nunca degeneran aunque el receptor auditivo haya sido sustituido por un epitelio no funcional (Bartolomé M.V. y cols. (2001) NeuroReport 12, 3107-3110).

45

Regenerar neuritas a partir de neuronas envejecidas del ganglio espiral

50

El envejecimiento y las posibles modificaciones genéticas y moleculares que sufren las células antes de morir está siendo motivo de diferentes estudios multidisciplinarios en diferentes estirpes celulares, en diferentes órganos y sistemas. La medicina regenerativa es un nuevo campo de la investigación en biomedicina que pretende regenerar el daño celular que conlleva la pérdida de la función y posterior muerte celular.

55

La muerte neuronal en un sistema tan complejo como es el sistema nervioso, ya sea periférico o central, conlleva una mayor dificultad para abordar la regeneración en animales adultos y envejecidos, ya que en general no es posible *in vivo* la regeneración espontánea de las neuronas maduras.

La implicación de diferentes factores tróficos como neurotrofina-3 (NT-3) y factor trófico derivado de cerebro (BDNF) han empezado a tener especial relevancia en regeneración neuronal en especímenes adultos.

60

Los escasos estudios que recoge la literatura científica y los pocos métodos patentados ponen de manifiesto la gran dificultad que conlleva la obtención de las neuronas adultas del ganglio espiral y el mantenimiento de los cultivos a largo plazo. Hay dos importantes evidencias que justifican la escasez de métodos publicados:

65

- primera: el número de neuronas es escaso en el adulto normooyente (aproximadamente unas 30.000 neuronas), este número decrece durante la presbiacusia o sordera relacionada con el envejecimiento.
- segunda: el modiolos donde se aloja el ganglio espiral tiende a endurecerse y dificultar la disección para acceder a las neuronas.

Por todo ello, los diferentes mecanismos y factores implicados en la pérdida neuronal en el ganglio espiral durante el envejecimiento son aún bastante desconocidos.

La patente nº US20020176859-A1 recoge un amplio número de procedimientos realizados exclusivamente en cultivo de órgano (cultivo de cóclea completa) de rata de 3 días postnatales. El procedimiento y la metodología para realizar y mantener un cultivo de órgano permiten analizar procesos o cambios biológicos, morfológicos y funcionales dentro de un órgano completo. Este tipo de cultivos presentan un gran inconveniente ya que el órgano en estas condiciones *in vitro* sólo puede mantenerse en condiciones óptimas durante 70 a 80 horas. Son cultivos de corta duración, porque los tejidos se necrosan en poco tiempo ya que la difusión de nutrientes y gases es deficiente y no llegan a difundir fácilmente dentro del órgano completo *in vitro*.

Los escasos trabajos realizados con neuronas adultas de ganglio espiral describen protocolos muy complejos y agresivos para unas neuronas que son muy poco viables en condiciones *in vitro* (Banker G y Goslin K. 1998, *Culturing nerve cells*. Ed. MIT. Press, Cambridge). Los métodos que se utilizan en estos trabajos para obtener neuronas adultas disociadas, son los métodos previamente diseñados por otros autores para cultivo de neuronas procedentes de animales neonatales o postnatales, sin considerar que la edad del animal es un factor determinante para la viabilidad de las neuronas *in vitro*. Estos métodos se basan en el cultivo de neuronas adultas disociadas y hacen referencia a la supervivencia y regeneración de neuronas *in vitro* del ganglio espiral de ratones y humanos adultos analizando la posible viabilidad de estas neuronas adultas en condiciones muy diferentes a las presentadas en esta invención. En los trabajos realizados en ratones C57BL/6J de 2-3 meses de edad (Wei D. y cols. 2006. *Developmental Neurobiology* 67.108-122), cobayas sin determinar la edad (Rask-Andersen H y cols 2005. *Hearing Research* 203. 180-191) y humanos de 40 y 60 años de edad (Rask-Andersen H y cols 2005. *Hearing Research* 203. 180-191), las neuronas del ganglio espiral se encuentran dentro de microesferas o microcápsulas en flotación (Brewer GJ y Torricelli JR (2007) *Nature Protocols* 2 1490-1498). Estas condiciones y habitat artificiales *in vitro* en los que proliferan las neuronas del ganglio espiral son muy diferentes a las que tienen *in vivo*.

En otros casos, se trabaja con explantes de hipocampo de ratas y ratones adultos en la manipulación, proliferación y supervivencia de las neuronas *in vitro* (Brewer GJ and Torricelli JR (2007). *Nature Protocols* 2 1490-1498). Debido a los órganos utilizados por Brewer y Torricelli, hipocampo y corteza cerebral, quedan soslayados los problemas que supone la localización del ganglio espiral dentro de una estructura ósea (el modíolo) que dificulta la extracción de las neuronas y su posterior manipulación.

Vieira y cols (Hearing Research (2007), doi:10.1016/j.heares.2007.03.005) han descrito recientemente un experimento piloto para cultivo de neuronas disociadas de ganglio espiral de ratones de 30 y 72 días de edad. Los resultados obtenidos muestran unos cultivos mixtos, es decir, cultivos contaminados con otras estirpes celulares, que los autores identifican como fibroblastos y astrocitos, junto con neuronas de ganglio espiral.

Estos métodos para obtener la disociación completa de las neuronas de ganglio espiral adulto se refieren a unos protocolos y unas condiciones de cultivo muy diferentes a los requerimientos exclusivos y específicos para neuronas adultas, ya que las neuronas adultas están consideradas como las células menos viables en cultivos disociados (Banker G y Goslin K. 1998, *Culturing nerve cells*. Ed. MIT. Press, Cambridge).

La obtención y mantenimiento de los explantes de la presente invención se propone como el método idóneo para regenerar neuritas a partir de neuronas adultas de ganglio espiral en condiciones *in vitro*, implantando una nueva herramienta para su uso en la recuperación y el tratamiento de los procesos degenerativos del ganglio espiral y en consecuencia del sistema auditivo.

Descripción de la invención

La regeneración de neuritas en el ganglio espiral de roedores adultos y envejecidos en condiciones *in vitro* requiere determinadas condiciones específicas y diferentes a otros tipos de neuronas debido a las características y particularidades anatómicas y funcionales de la cóclea y el sistema auditivo.

La presente invención se refiere a un método de obtención y mantenimiento de explantes mediante la combinación de diferentes productos que permiten mantener en condiciones *in vitro* neuronas que son ya muy escasas *in vivo* (en el humano hay aproximadamente 30000); aún así, un número importante de ellas están siempre presentes aunque haya degenerado el receptor auditivo y éste haya sido sustituido por un epitelio de cicatrización. Estas neuronas que conforman el ganglio espiral están encastradas en un hueso o modíolo, lo que dificulta enormemente su obtención y manipulación en animales adultos por la osificación del hueso y posterior osteoporosis en animales muy envejecidos. En cócleas de animales de más de 20 días de edad el hueso se osifica y se endurece y el ganglio íntimamente adherido a él dificulta la separación de ambos. En animales de 12 a 24 meses de edad, la fragilidad del hueso (osteoporosis ósea) presente en la gran mayoría de estos animales dificulta la disociación mecánica.

La presente invención permite mantener los explantes de ganglio espiral en condiciones *in vitro* durante un periodo de tiempo de 10 a 15 días. Este periodo de tiempo es suficiente para regenerar neuritas y así recuperar su funcionalidad y actividad neuronal. Además, esta invención permite analizar la alteración de los diferentes factores y receptores neuronales implicados en hipoacusias y sorderas neurosensoriales, especialmente en la presbiacusia, por lo que el

ES 2 321 370 B1

método aquí descrito es útil y viable para paliar y mejorar la audición en un amplio tipo de patologías auditivas de mamíferos incluido el ser humano.

5 El método de la presente invención permite mantener los explantes de ganglio espiral de animales adultos y envejecidos en las condiciones óptimas de cultivo para conseguir la regeneración neuronal, teniendo en cuenta que estas condiciones *in vitro* no precisan de métodos de trabajo sofisticados, laboriosos y costosos en recursos económicos, ni profesionales altamente cualificados para su manipulación. Las condiciones *in vitro* a las que están sometidos los explantes favorecen la aplicabilidad de los resultados en biomedicina y medicina regenerativa aplicada a la hipoacusia, sorderas neurosensoriales, especialmente al paciente presbiacúsico, patologías todas ellas muy comunes en la consulta
10 diaria en otorrinolaringología.

Un aspecto de esta invención se refiere a la extracción de los explantes por disociación mecánica de la cóclea, teniendo en cuenta que este paso debe realizarse con rapidez para evitar la muerte neuronal por hipoxia, falta de
15 nutrientes, y temperatura inferior a 37°C.

En la presente invención se han utilizado explantes de ganglio espiral de 0,1 mm a 0,3 mm de longitud de rata y ratón tanto adultos como muy envejecidos. Así como de animales albinos y animales pigmentados. Se utilizan ratas albinas (Wistar y Sprague Dawley) que, por carecer de melanocitos en la estría vascular (estructura que forma parte del receptor auditivo) tienen una audición diferente a las ratas pigmentadas (Long Evans). Los ratones Balbc son albinos y
20 los ratones C57B16/J son pigmentados. Todos los animales albinos o pigmentados son animales normooyentes excepto los ratones C57BL6/J. Estos ratones presentan una alteración en el gen AHL (age-hearing-loos) situado en el cromosoma 10, dando lugar a ratones que envejecen prematuramente y adquieren una presbiacusia muy similar a la observada en humanos. Mediante la utilización de explantes procedentes de animales albinos y pigmentados se ha comprobado que la regeneración de neuritas a partir de neuronas de ganglio espiral adulto y envejecido no es dependiente del tipo
25 de pigmentación del animal ni, por tanto, del tipo de audición ni del tipo de hipoacusia neurosensorial.

Otro aspecto de esta invención hace referencia a la disociación enzimática en caliente (37°C) con tripsina y en presencia de ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA). El tiempo de disociación enzimática por la tripsina a altas concentraciones (1%) y en caliente es de 5 a 15 minutos, variando el tiempo según la dureza y resistencia del hueso
30 modiollo, y preferentemente de 10 minutos, ya que acortando el tiempo del procedimiento se favorece la viabilidad de los explantes *in vitro*, facilitando la regeneración neuronal.

El método de la presente invención incluye la adición de suero de caballo para inhibir la actividad enzimática de la tripsina. Además, el suero de caballo favorece la adhesión del explante al sustrato, aporta factores tróficos y nutrientes
35 necesarios para las neuronas adultas en condiciones *in vitro*.

La disociación mecánica rápida, seguida de una disociación enzimática no agresiva ni invasiva para el ganglio espiral, permite la obtención de explantes y la degradación del hueso sin necesidad de utilizar ultracentrifugación que deteriore las neuronas.
40

Este método también incluye la colocación de los restos de hueso que no haya sido posible separar del explante en contacto con el medio de cultivo, alejándolo del contacto con el sustrato.

Otro aspecto de esta invención se refiere a la adhesión del explante a una superficie cargada positivamente mediante la combinación de diferentes polímeros y considerando las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de polimerización según el tipo de compuesto. La polimerización puede realizarse en diferentes grados de temperatura, así:
45

- La polimerización en frío tiene lugar entre 4°C y 10°C.
50
- La polimerización a temperatura ambiente tiene lugar entre 18°C y 22°C.
- La polimerización en caliente, entre 35°C y 37°C. La temperatura debe ser inferior a 40°C, ya que la inestabilidad de los enlaces que conforman los polímeros aumenta con altas temperaturas haciendo inviable el polímero.
55

Las neuronas en general son las células animales con menor capacidad de adhesión en condiciones *in vitro*. En este método las neuronas utilizadas son adultas y envejecidas, con alteraciones estructurales ya *in vivo* debidas a la edad del individuo y, por tanto, estas neuronas tienen menor capacidad de adhesión que neuronas procedentes de animales de edad embrionaria o postnatales.
60

En la presente invención se utiliza como sustrato un cóctel de polímeros formado por fibronectina, colágeno y laminina y su polimerización se realiza preferentemente en frío (6-8°C) durante un tiempo superior a las 12 horas, siendo de elección las 24 horas. La polimerización de la poli-L-lisina se realiza en un rango de temperatura que va de la temperatura ambiente a 37°C durante 3-8 horas y, preferentemente, a 37°C durante 8 horas.
65

En la presente invención también se incluyen componentes nutricionales y factores tróficos, cuyas concentraciones específicas constituyen el medio acondicionado de cultivo óptimo para mantener y regenerar neuritas en neuronas

ES 2 321 370 B1

adultas y envejecidas. La presente invención estandariza y simplifica las condiciones *in vitro* para la regeneración neuronal en el sistema auditivo. El medio acondicionado de la presente invención está formado por diferentes compuestos utilizados en concentraciones no tóxicas para la neurona y permite su adaptación a las condiciones *in vitro* sin alterar considerablemente la permeabilidad y difusión de nutrientes a través de la membrana plasmática facilitando la recaptación e incorporación de los nutrientes a los diferentes componentes citoplasmáticos no sólo para nutrir la neurona sino, además, para permitir que en presencia de factores neurotróficos se regeneren de nuevo *in vitro* neuritas a partir de neuronas ya adultas y envejecidas.

El medio acondicionado de la presente invención incluye:

- Neurobasal A™ (medio sin L-Glutamina).
- 5-20% Suero de caballo.
- 1-3% Hepes.
- 1-2% Suplemento B27.
- 1-2% Suplemento N2.
- 0,5-1% Glucosa.
- 0,5-1% Glutamina.
- 10-100 ng/ml *Recombinant Human Epidermal Growth Factor* (EGF).
- 10-100 ng/ml *Fibroblast Growth Factor* (FGF).
- 10-100 ng/ml *Recombinant Human Insulin Growth Factor I* (GF-I).
- 10-100 ng/ml *Growth Associated Protein - 43* (GAP-43).
- 1/100 Penicilina.

Esta combinación de componentes evita el crecimiento de tipos celulares diferentes a las neuronas, especialmente fibroblastos.

La gran mayoría de las neuronas adultas *in vivo*, así como *in vitro*, no proliferan y las neuronas del ganglio espiral no son una excepción. El cultivo de explante de neuronas adultas de ganglio espiral, para que pueda ser mantenido en condiciones *in vitro*, necesita suplementos adicionales que no vienen incorporados en el medio de cultivo como el complemento B27, el complemento N2, el complejo formado por: insulina+ transferrina+ selenio, Insulina. En este método se incluyen simultáneamente los complementos B27 y N2. Así mismo, la presencia de los diferentes factores de crecimiento *Recombinant Human Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Recombinant Human Insulin Growth Factor I* (GF-I), *Murine Nerve Growth Factor* (NGF) en concentraciones de 10 a 100 ng/ml favorece la regeneración de neuritas a partir neuronas adultas, aunque son los dos factores de crecimiento *Brain Derived Growth Factor* (BDNF) y *Neurophin 3* (NT-3) sobre los que recae la función primordial de la regeneración de neuritas en animales postnatales. En la presente invención se incorpora al medio acondicionado, además del conjunto de factores de crecimiento que se detallado anteriormente, *Growth Associated Protein- 43* (GAP-43) en concentraciones entre 10 y 100 ng/ml.

Esta invención constituye una herramienta muy útil e indispensable para avanzar en el conocimiento de la sordera, la biomedicina y la medicina regenerativa del sistema auditivo, con el fin de aportar nuevas estrategias y alternativas en la práctica clínica de Otorrinolaringología. Con la presente invención se optimiza el cultivo de explantes de ganglio espiral para regenerar neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas en condiciones *in vitro* de manera que se pueden fabricar, con estas neuritas, implantes para el tratamiento de sorderas neurosensoriales en mamíferos, incluidas las hipoacusias.

La invención permite obtener resultados sin someter las neuronas a condiciones inviables *in vivo* y, por tanto, mejorar los problemas relacionados con hipoacusias y diferentes sorderas neurosensoriales incluida la presbiacusia, patología cada vez más frecuente en la clínica de Otorrinolaringología de las sociedades desarrolladas.

Modo de realizar la invención

Animales utilizados

Los roedores en cautividad se consideran animales adultos desde el momento que se reproducen. Así las ratas alcanzan su madurez sexual a partir de 2 meses, para los ratones la edad adulta es a partir de 1 mes. Ratas y ratones pueden vivir en cautividad una media de 24, 28 meses de edad.

ES 2 321 370 B1

El método se ha empleado tanto en ganglio espiral de ratas como en ganglio espiral de ratones adultos y envejecidos. Las estirpes de rata utilizadas fueron Long Evans, Wistar y Sprague Dawley con edades comprendidas entre los 2 y los 24 meses de edad. Para los explantes obtenidos de ratones se utilizaron ratones C57BL/6J y Balbc desde 1 mes de edad hasta 24 meses. En los ratones C57BL/6J el envejecimiento prematuro que se observa a los 6 meses de edad supone una pérdida de audición y alteración del receptor auditivo equivalente a una hipoacusia observada en un ratón normooyente de 15 meses y una presbiacusia en un humano de 60 años, aproximadamente.

Anestesia

Los animales fueron anestesiados antes de ser decapitados. La anestesia utilizada fue hidrato de cloral al 8% en tampón fosfato salino 0,1M, pH = 7,34 y la anestesia se administró por vía intraperitoneal (300 mg/Kg de peso).

Todos los animales, antes de la decapitación, fueron sumergidos en alcohol al 70% para evitar la contaminación del cultivo con posibles microorganismos que pudieran ser transmitidos por el pelo.

Disociación

El material quirúrgico (pinzas y tijeras) fue previamente esterilizado en autoclave. La disección y disociación del ganglio espiral se realizó en campana de flujo laminar horizontal y con ayuda de un microscopio estereoscópico (lupa).

Disociación mecánica

La disociación mecánica se realizó en placa Petri 1008 en una solución estéril de EDTA 10% en D-PBS (+CaCl₂+MgCl₂) previamente calentado a 37°C.

Disociación enzimática

Terminada la disociación mecánica, los explantes se pusieron en una solución de 1% de tripsina-EDTA en D-PBS (+CaCl₂+MgCl₂), a 37°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo se inhibió la actividad enzimática de la tripsina con suero de caballo a 37°C durante 10 min.

Preparación de las placas de cultivo

Para el cultivo de explantes de ganglio espiral se emplearon:

- Placas estériles de 48 pocillos.
- Cubreobjetos redondos previamente esterilizados y tratados con el mismo sustrato y el protocolo utilizado para las placas multipocillo. El uso de cubreobjetos de cristal facilitó el poder manipular el cubreobjetos y pegarlo a un portaobjetos. Así, con este tratamiento, posteriormente se realizaron diferentes técnicas para microscopía óptica y electrónica que de otro modo no hubiera sido posible llevar a cabo en la placa de cultivo.
- En cada pocillo o en cada cubreobjetos de cristal se colocó un único explante, de una longitud aproximada 0,1 a 0,3 mm, de manera que los restos de hueso quedaran en contacto con el medio de cultivo pero no con el sustrato.

Sustratos

- Se preparó una primera solución de sustratos formada por:
0,5 mg/ml fibronectina, más 0,5 mg/ml colágeno y 0,5 mg/ml laminina en tampón D-PBS (+CaCl₂+MgCl₂). En cada pocillo se depositaron 200 µl de esta solución y se mantuvo durante 24 horas en nevera a 8°C.
- Se lavaron los pocillos 3 veces, 5 minutos cada vez, con tampón D-PBS (+CaCl₂+MgCl₂).
- Se preparó una segunda solución de 1 mg/ml poli-L-lisina en medio de cultivo Neurobasal A™. En cada pocillo se depositó un volumen de 200 µl de esta solución y se mantuvo durante 8 horas a 37°C.
- Transcurrido este tiempo, se retiró la poli-L-lisina y se lavaron los pocillos 3 veces, 5 minutos cada vez, con tampón fosfato D-PBS (+CaCl₂+MgCl₂).
- Finalmente se añadió a cada pocillo 110 µl de medio de cultivo acondicionado.

ES 2 321 370 B1

Medio de cultivo acondicionado

El medio de cultivo acondicionado incluía:

- 5 • Neurobasal A™ (medio sin L-Glutamina).
- 10% Suero de caballo.
- 2,5% Hepes.
- 10 • 1% Suplemento B27.
- 1% Suplemento N2 (100X).
- 15 • 1% Complejo formado por: insulina+ transferrina+ selenio.
- 1% L-Glutamina.
- 0,6% Glucosa.
- 20 • 2 mg/ml Insulina.
- 100 ng/ml *Recombinant Human Epidermal Growth Factor* (EGF).
- 25 • 100 ng/ml *Fibroblast Growth Factor* (FGF).
- 20 ng/ml *Recombinant Human Insulin Growth Factor I* (GF-I).
- 40 ng/ml 2.5S *Murine Nerve Growth Factor* (NGF).
- 30 • 40 ng/ml *Brain Derived Growth Factor* (BDNF).
- 25 ng/ml *Neutrophin 3* (NT-3).
- 35 • 1/100 Penicilina.
- 25 ng/ml *Growth Associated Protein- 43* (GAP-43).

40 *Condiciones de cultivo en incubador de células*

Las condiciones de cultivo en el incubador de células fueron las siguientes:

- 45 • El grado de humedad dentro del incubador de células fue a saturación atmosférica.
- La temperatura constante de 37°C.
- La composición de gases fue de 5% CO₂ y 95% de aire estéril.

50 *Cambio de medio de cultivo*

55 A las 24 horas de haber depositado los explantes en la placa con el medio acondicionado se añadieron 30 µl más de medio acondicionado nuevo. El primer cambio completo de medio se realizó a las 30 horas de haber depositados los explantes. Los siguientes cambios de medio se realizaron transcurridas 50-60 horas. En todos los cambios de medio se utilizó el mismo medio acondicionado descrito anteriormente.

60

65

ES 2 321 370 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral que comprende los siguientes pasos:
 - a. obtención de explantes por disociación mecánica rápida de la cóclea en presencia de EDTA calentado a 37°C y disociación enzimática con tripsina y EDTA a 37°C durante 5-15 minutos, e inhibición de la tripsina con suero de caballo a 37°C durante 10-20 minutos.
 - 10 b. adhesión de los explantes a una superficie cargada positivamente mediante una primera solución que incluye fibronectina, colágeno y laminina en tampón D-PBS (+CaCl₂+MgCl₂) y polimeriza en frío, una segunda solución que incluye poli-L-lisina en medio de cultivo Neurobasal A™ y polimeriza a temperatura ambiente o en calor, y la colocación del explante de manera que los restos de hueso queden alejados del sustrato.
 - 15 c. cultivo de los explantes en un medio de cultivo acondicionado que incluye: suero de caballo, los suplementos B27 y N2, complejo formado por: insulina+ transferrina+ selenio, L-glutamina, glucosa simultáneamente y los factores de crecimiento *Recombinant Human Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Recombinant Human Insulin Growth Factor I* (GF-I), *Murine Nerve Growth Factor* (NGF).
 - 20 d. proliferación de neuritas en presencia de *Brain Derived Growth Factor* (BDNF), *Neutrophin 3* (NT-3) y *Growth Associated Protein- 43* (GAP-43).
- 25 2. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la disociación enzimática con tripsina y EDTA a 37°C se realiza durante 10 minutos.
- 30 3. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque en la disociación enzimática la inhibición de la tripsina con suero de caballo se realiza durante 10 minutos.
- 35 4. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la polimerización de fibronectina, laminina, colágeno para la adhesión del explante se realiza a 8°C durante 24 horas.
- 40 5. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la poli-L-lisina polimeriza a 37°C durante 8 horas.
- 45 6. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración de los factores de crecimiento utilizados es entre 10 y 100 ng/ml de medio de cultivo acondicionado.
- 50 7. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la concentración de *Brain Derived Growth Factor* (BDGF) es de 40 ng/ml de medio de cultivo acondicionado.
- 55 8. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la concentración de *Growth Associated Protein-43* (GAP-43) es de 25 ng/ml de medio de cultivo acondicionado.
- 60 9. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración de glucosa en el medio de cultivo acondicionado es entre 0,5 y 1%.
- 65 10. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la concentración de glucosa en el medio de cultivo acondicionado es de 0,6%.
- 70 11. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración de glutamina en el medio de cultivo acondicionado es entre 0,5 y 1%.
- 75 12. Método para la regeneración de neuritas a partir de neuronas adultas y envejecidas de ganglio espiral, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la concentración de glutamina en el medio de cultivo acondicionado es del 1%.
- 80 13. Uso del método descrito en las reivindicaciones anteriores para obtener neuritas con las que fabricar implantes para el tratamiento de sorderas neurosensoriales en mamíferos.
- 85 14. Uso según reivindicación 13, donde las sorderas neurosensoriales son hipoacusias.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 321 370

② N° de solicitud: 200702012

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.07.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 5/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WEI, D. et al.: "Survival, Synaptogenesis, and Regeneration of Adult Mouse Spiral Ganglion Neurons In Vitro", J. Neurobiol., vol. 67, (1), pp.: 108-122 (enero de 2007, publicado on-line el 01.12.2006); todo el documento, en particular, pág. 109, 2ª columna, 1er a 3er párrafos; pág. 110, 1ª columna, 1er párrafo.	1-13
A	CORRALES, C.E. et al.: "Engraftment and Differentiation of Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells in the Cochlear Nerve Trunk: Growth of Processes into the Organ of Corti", vol. 66, (13), pp.: 1489-1500, (2006); todo el documento.	1-13
A	VIEIRA, M. et al.: "Survival and Stimulation of Neurite Outgrowth in a Serum-Free Culture of Spiral Ganglion Neurons from Adult Mice", Hearing Res., vol. 230, (1-2), pp.: 17-23; todo el documento.	1-13
A	US 20020176859 A1 (GAO, W.-Q.) 28.11.2002	

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
17.04.2009

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1