



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 375 860**

21 Número de solicitud: 201030493

51 Int. Cl.:
C12N 5/0797 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **31.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.03.2012

71 Solicitante/s: **Fundación Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración (FUHNPAIIN)**
Finca La Peraleda, s/n
45071 Toledo, ES

72 Inventor/es: **Castro Soubriet, Fernando de y Arenzana Sanagérico, Francisco Javier**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método para la obtención de células precursoras de oligodendrocitos.**

57 Resumen:

Método para la obtención de células precursoras de oligodendrocitos.

Método para la purificación de células precursoras de oligodendrocitos (POs) de corteza cerebral a partir de la corteza cerebral de un mamífero de edad superior a una semana, que comprende: obtener una muestra aislada de cerebro; seleccionar las POs de la muestra biológica obtenida anteriormente y cultivar las POs en condiciones de proliferación, migración, movilidad o diferenciación celular. Además, la presente invención se refiere a los Pos obtenidos por el método de la invención y a las líneas celulares derivadas del mismo.

ES 2 375 860 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la obtención de células precursoras de oligodendrocitos.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la neurobiología y la biomedicina. Específicamente, se refiere a un método para la purificación de células precursoras de oligodendrocitos (POs) de corteza cerebral a partir de ejemplares de edad madura.

Estado de la técnica

10 Los axones de muchas neuronas de vertebrados están aislados por la vaina de mielina, que aumenta enormemente la velocidad con la que el axón puede conducir el potencial de acción. Los oligodendrocitos son los responsables de la formación de la mielina en el sistema nervioso central (SNC). Estos oligodendrocitos envuelven el axón capa a capa con su propia membrana hasta formar una estrecha espiral, la vaina, que aísla la membrana del axón de manera que no se pierde apenas intensidad del impulso eléctrico. La vaina se interrumpe en los nódulos de Ranvier, que están espaciados regularmente y son puntos donde se concentran casi todos los canales de sodio. Estas excelentes características de la envuelta del axón hacen que la despolarización de la membrana en un nodo se extienda casi inmediatamente y de manera pasiva al siguiente. Así, el potencial de acción se propaga a lo largo del axón mielinizado saltando de nodo en nodo. Esta conducción tiene dos ventajas principales: los potenciales de acción viajan más rápido y la energía metabólica se conserva porque sólo se dispersa en pequeñas regiones de la membrana axonal en los nódulos de Ranvier.

25 La importancia de la mielinización viene demostrada por las enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple, en la que la vaina de mielina en algunas regiones del SNC es destruida por algún mecanismo todavía desconocido.

30 Los oligodendrocitos son células post-mitóticas, totalmente diferenciadas, que no se dividen *in vivo*, lo cual dificulta su cultivo *in vitro* a largo plazo (Verity y cols, 1993 J Neurochem. 60(2):577-87). Los POs, que tienen capacidad de proliferar, migrar y de diferenciarse, ofrecen la posibilidad de estudiar los mecanismos moleculares y celulares de diferenciación morfofuncional, así como los procesos de mielinización, desmielinización y remielinización *in vitro*, y pueden ser una fuente para promover la mielinización y/o la remielinización *in vivo*, con especial importancia en patologías desmielinizantes.

35 Todas las células del SNC provienen de las células troncales neuroepiteliales. Éstas dan lugar tanto a las neuronas como a la macroglia. Las células gliales son los astrocitos y los oligodendrocitos, que se distinguen por varias características. Los oligodendrocitos son de menor tamaño y presentan mayor densidad en su núcleo y su citoplasma. Carecen de filamentos intermedios y glucógeno en su citoplasma y presentan un elevado número de microtúbulos (Peters y cols, 1991, Anat Rec; 229(3):384-98).

40 El oligodendrocito puede tener muchos procesos o extensiones celulares y cada una de ellas contacta y envuelve repetidas veces una porción de axón neuronal. Cuando estas envueltas se condensan, la espiral de membrana forma la vaina de mielina. En el mismo axón, los segmentos de mielina adyacentes pertenecen a distintos oligodendrocitos y cada unidad de mielina termina cerca de un nódulo de Ranvier (Bunge, 1968, Physiol Rev. 48(1):197-251).

45 Antes de madurar hasta formar la vaina de mielina, los oligodendrocitos pasan por varias etapas de desarrollo definidas por la expresión de receptores de superficie específicos y por su respuesta a distintos factores de crecimiento, entre otras moléculas. Así, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés "*platelet-derived growth factor*") se asocia tanto a la autorrenovación como a la generación de oligodendrocitos (Richardson y cols, 1988, Nature. 9; 333(6173):562-5.; Raff y cols, 1989 Development. 105(3):595-603; Noble y cols, 1988 Nature. 9; 333(6173):560-2).

50 Así, los POs se caracterizan por expresar Nestina⁺, A2B5⁺, NG2/AN2⁺, plp-dm20⁺, PDGFR α ⁺, GD3⁺, CNP⁺. Posteriormente los POs dan lugar a los preoligodendrocitos que expresan los mismos marcadores excepto Nestina y además presentan O4 (Rowitch, 2004, Nat Rev Neurosci. 5:409-417; de Castro y Bribián, 2005, Brain Res Brain Res Rev. 49(2):227-41).

El inicio de la diferenciación terminal (oligodendrocito inmaduro) se asocia a la síntesis y a la presencia en la superficie celular de galactosilceramidas (GalC), que reconoce el anticuerpo contra O1.

60 Los oligodendrocitos maduros expresan la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína proteolípida (PLP) y sintetizan la membrana de mielina. Otros marcadores moleculares expresados por los oligodendrocitos maduros son O4⁺, RIP⁺, GalC⁺, ACNP⁺, MAG⁺ (Rowitch, 2004, Nat Rev Neurosci. 5:409-417; de Castro y Bribián, 2005, Brain Res Brain Res Rev. 49(2):227-41).

65 Aunque la mayoría de los estudios de los progenitores O-2A y los oligodendrocitos maduros se han llevado a cabo en roedores, tanto células O-2A, como células multipolares A2B5⁺/O4⁺, así como oligodendrocitos maduros O1⁺ han sido identificados en cerebro fetal humano (Rivkin y cols, 1995, Ann Neurol; 38(1):92-101).

En el adulto, tanto los oligodendrocitos como los POs se distribuyen de manera homogénea por todo el SNC, principalmente en la sustancia blanca, pero también en la sustancia gris.

La proliferación y diferenciación de los POs (incluyendo el subsiguiente proceso de mielinización) siguen un gradiente caudorrostral a lo largo del tubo neural. Cada paso del proceso de diferenciación, desde la fase de precursor hasta la de oligodendrocito maduro, puede ser identificado por cambios en la morfología celular y en la expresión de marcadores inmunocitoquímicos, lo que se acompaña de un descenso paulatino de la capacidad proliferativa y migratoria (Almazán, G y cols, 2001, *Microsc Res Tech.* 15; 52(6):753-65; Rowitch, D, 2004, *Nat Rev Neurosci.* 5(5):409-19). La expresión de estos marcadores sirve incluso para diferenciar entre diversas poblaciones de oligodendrocitos. De hecho, se ha propuesto la existencia de dos poblaciones distintas de POs: una población dependiente del PDGF, población que denominamos PDGFR α^+ , y otra independiente de este factor de crecimiento, población plp/dm20 $^+$ (Spassky, N y cols, 2000, *Glia.* 15; 29(2):143-8; Spassky, N y cols, 1998, *J Neurosci.* 15;18(20):8331-43.; Pringle, NP y Richardson, WD, 1993, *Development.* 117(2):525-33.; Le Bras, B, 2005, *Int J Dev Biol.* 49(2-3):209-20). Ambas poblaciones de oligodendrocitos experimentan un variado patrón de migración para colonizar todo el SNC durante el desarrollo.

Durante el desarrollo, los oligodendrocitos se generan a partir de POs. Este tipo celular se ha descrito en el SNC de humanos adultos y constituye una fuente celular interesante para su uso en terapias regenerativas para el tratamiento de lesiones desmielinizantes, como por ejemplo la esclerosis múltiple. Este potencial resulta especialmente interesante, porque se ha demostrado que los axones pueden ser mielinizados a lo largo de toda la vida de las neuronas, incluso después de haber sufrido un proceso de desmielinización (Setzu y cols., 2004, *Glia* 45:307-311). En respuesta al daño desmielinizante, los POs endógenos migran hacia la zona de lesión, pero no son capaces de penetrar y remielinizar de manera efectiva, sino que se quedan en la periferia o, si penetran en la zona de lesión, mueren (Chang y cols, 2002, *N Engl J Med.* 346:165-173).

El estudio de los POs durante el desarrollo embrionario ha permitido conocer los mecanismos moleculares que regulan la migración, proliferación y diferenciación de este tipo celular. Sin embargo, existen pocos datos acerca de la biología de los POs en cerebro adulto, ya que hasta la fecha sólo se han podido aislar de manera eficiente los POs de embriones o neonatos. Por tanto, no se ha podido estudiar cuál es la fisiología de estos POs adultos, sus similitudes y divergencias con lo visto en POs embrionarios o postnatales tempranos.

La eficacia de cualquier proceso de purificación de un tipo celular dado es inversamente proporcional al tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra hasta el momento de la siembra de las células obtenidas en la combinación de un medio de cultivo y un sustrato que permitan su supervivencia. La purificación de POs a partir de tejido embrionario o perinatal es un proceso mucho más eficiente que a partir de tejido maduro o adulto, ya que en estadio embrionario o a corta edad la cantidad absoluta y la proporción relativa de POs son significativamente mayores, y con la edad, además, el potencial de supervivencia celular disminuye.

Hasta la fecha, la mayor parte de los estudios se han realizado con cultivos de POs purificados a partir de cerebro embrionario, preferentemente, o perinatal (desde recién nacido hasta, máximo, 3-4 días de edad). Hay pocos estudios en los que se obtengan POs a partir de tejido adulto, con la excepción del nervio óptico de rata (Shi y cols, 1998, *J Neurosci.* 18(12):4627-4636). Esto ha imposibilitado el estudio de la neurobiología de los POs adultos, lo cual es crucial para el avance de la investigación sobre las enfermedades desmielinizantes en cuanto a la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas y al desarrollo de la medicina regenerativa se refiere.

Las líneas celulares son una herramienta útil y de uso frecuente en la búsqueda de nuevos fármacos. Las líneas celulares se obtienen de forma espontánea o artificial a partir de cultivos celulares primarios. Estas células pueden proliferar indefinidamente y se usan frecuentemente como modelos para el estudio de las células de las que proceden.

En el caso de la oligodendroglia, se han descrito líneas celulares oligodendrogliales de rata derivadas de cerebros de animales de 2 días de edad, como la línea CG-4, descrita por Louis y cols en 1992 (*J Neurosci Res.* 1992; 31(1):193-204) o la línea OL-1, descrita por Lagarde y cols en 2007 (*Int J Dev Neurosci.* 2007 25(2):95-105). Las líneas celulares oligodendrogliales humanas descritas proceden de gliomas, oligodendrogliomas o de oligodendrocitos fusionados con células tumorales humanas (Buntinx y cols 2003, *J Neurocytol.* 32(1):25-38). Estas células de origen tumoral no pueden usarse de manera segura en el estudio de la neurobiología oligodendrogliar, ni como herramienta terapéutica para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes, pues se desconoce su proceso de inmortalización. Por todo esto, una línea celular de POs humanos obtenida mediante un proceso de inmortalización controlada sería de gran utilidad para la realización de ensayos de respuesta a fármacos y ensayos de terapia celular en enfermedades desmielinizantes.

El SNC está rodeado de tres capas de tejido conectivo de origen mesodérmico conocidas como las meninges (dura madre, aracnoides y piamadre), que protegen el SNC, entre otras cosas, frente a infecciones y contienen el líquido cefalorraquídeo (LCR) en el espacio subaracnoideo, protegiendo también mecánicamente el SNC. Los plexos coroides son las zonas de los ventrículos cerebrales donde se produce el LCR y están formados por capilares sanguíneos enrollados sobre sí mismos, limitados por células endoteliales, revestidos de un tejido conjuntivo laxo y finalmente recubiertos por un tejido epitelial. Para la purificación de los POs es necesaria la completa retirada tanto de las meninges como de los plexos coroides, para evitar la contaminación del cultivo con células procedentes de otros tejidos. Los

ES 2 375 860 A1

métodos de purificación de POs descritos hasta ahora solucionan la retirada de las meninges y los plexos coroideos con una ardua, lenta, laboriosa y delicada disección con pinzas bajo el microscopio estereoscópico, lo cual incrementa la muerte celular significativamente especialmente en ejemplares adultos.

- 5 Es necesario, por tanto, un procedimiento sencillo y que permita la purificación de POs a partir de tejido neural maduro o adulto, que permita el estudio de la neurobiología de esta población celular, así como la realización de ensayos de respuesta a fármacos y ensayos de terapia celular en enfermedades desmielinizantes.

Descripción de la invención

10 Los autores de la presente invención proporcionan un método para el aislamiento y la purificación de POs de cerebro maduro y adulto que permite:

- 15 i. estudiar la neurobiología de POs adultos, más concretamente los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular,
- ii. estudiar los efectos de determinados fármacos en los POs,
- 20 iii. realizar estudios de criba de moléculas para encontrar nuevas dianas terapéuticas para las enfermedades desmielinizantes y
- iv. ensayar terapias celulares en modelos animales de lesiones desmielinizantes.

25 Además, el procedimiento de la presente invención permite disminuir la duración del proceso de purificación celular e incrementa considerablemente la supervivencia de los POs y, con ello, la eficacia del método valorada en el número final de células obtenido.

30 Esto se consigue eliminando la mayor parte de las meninges y los plexos coroideos mediante una digestión enzimática. Como se detalla en el ejemplo 1, la incubación de los cerebros previamente disecados en una solución de la cistein-proteasa papaína a una concentración (variable según la edad) durante 5 minutos a 37°C, permite la rápida separación de estos tejidos del tejido nervioso de interés.

35 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de POs a partir de la corteza cerebral de un mamífero de edad superior a una semana, que comprende:

- a) obtener una muestra aislada de cerebro,
- b) seleccionar las POs de la muestra biológica obtenida en (a) y
- 40 c) cultivar las POs en condiciones de proliferación o diferenciación.

45 El término “precursor de oligodendrocito” o PO tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una célula que aún no se ha diferenciado en un oligodendrocito maduro, y que tiene potencial para diferenciarse en oligodendrocitos. En un aspecto de la invención, el PO puede caracterizarse por el fenotipo Nestina⁺/PSA-NCAM⁺/plp-dm20⁺/PDGFR α ⁺. En otro aspecto de la invención, el PO puede caracterizarse por el fenotipo Nestina⁺/A2B5⁺/NG2/AN2⁺/plp-dm20⁺/PDGFR α ⁺/GD3⁺/CNP⁺. Incluso en otro aspecto de la invención, el PO puede caracterizarse por el fenotipo A2B5⁺/NG2/AN2⁺/plp-dm20⁺/PDGFR α ⁺/O4⁺/GD3⁺/CNP⁺. Nestina, PSA-NCAM, PLP, PDGFR α , A2B5, NG2, O4, GD3 y CNP se refieren a la expresión de marcadores citoplásmicos o de superficie que sean proteínas que se reconozcan por los anticuerpos Nestina, PSA-NCAM, PLP, PDGFR α , A2B5, NG2, O4, GD3 y CNP, respectivamente.

55 El término “cerebro” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a tejido neural de mamífero de edad superior a 7 días, incluyendo el prosencéfalo, el hipocampo, el cerebelo, la corteza, el estriado, el telencéfalo, el diencefalo, el mesencéfalo, el hipotálamo, el locus coeruleus y el rombencéfalo.

60 El término “mamífero” tal y como se usa en la presente invención, se utiliza para referirse a cualquier organismo del superreino Eukaryota, reino Metazoa, phylum Chordata, subphylum Craniata, superclase Gnathostomata y clase Mammalia, y se refiere a cualquier especie de mamífero, incluyendo humanos, primates no humanos, roedores, equinos, caninos, felinos, bovinos, porcinos, ovinos y lagomorfos.

65 Preferiblemente, el mamífero tiene más de una semana de edad. Más preferiblemente, el mamífero tiene más de dos semanas de edad. Aún más preferiblemente, el mamífero tiene entre 15 días y 9 meses de edad. Mucho más preferiblemente, el mamífero tiene entre 15 días y 6 meses de edad. Preferiblemente, el paso (b) comprende la digestión enzimática de la muestra obtenida según (a). Más preferiblemente, la enzima empleada para la digestión del paso (b) es la papaína. Aún más preferiblemente, la concentración de papaína empleada para la digestión del paso (b) es de entre 50 y 200 microgramos/mililitro.

ES 2 375 860 A1

En una realización preferida, el paso (b) comprende:

- i. una primera digestión enzimática de la muestra obtenida según (a),
- ii. retirar las meninges y los plexos coroideos,
- iii. disociar mecánicamente el tejido nervioso resultante del paso (ii), y
- iv. disociar enzimáticamente el tejido nervioso resultante del paso (iii).

Preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 150 y 200 microgramos/mililitro. Más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 160 y 190 microgramos/mililitro. Aún más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 170 y 185 microgramos/mililitro.

Preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 50 y 120 microgramos/mililitro. Más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 60 y 110 microgramos/mililitro. Aún más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 70 y 100 microgramos/mililitro.

Preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (b) es de entre 2 y 22 minutos.

Preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (i) es de entre 3 y 7 minutos. Más preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (i) es de entre 4 y 6 minutos.

Preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (iv) es de entre 8 y 18 minutos. Más preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (iv) es de entre 9 y 16 minutos.

Preferiblemente, el paso (b) comprende una digestión enzimática de la muestra obtenida según (a) con DNasa. Más preferiblemente, el paso (b) comprende una digestión enzimática de la muestra obtenida según (a) con DNasa-I.

La eficiencia del método de la invención se ha contrastado con el método de purificación celular mediante FACS (del inglés “*Fluorescence Activated Cell Sorting*”) y con el kit comercial denominado “*Oligodendrocyte Selection Kit*” de Heraclitus Biosciences (HB), como está descrito en los ejemplos 1-3. Además, se contrasta también la eficiencia del método de la invención con el descrito en el ejemplo 4, donde se purifican POs a partir de nervio óptico de rata adulta mediante inmuno-adsorción.

TABLA 1

Comparativa de la eficiencia del método que describe la invención con la de otros métodos ya descritos (FACS, Kit de Heraclitus Biosciences (Kit HB) e inmuno-adsorción)

Ejemplo	Método	Eficiencia en adulto (miles de células/animal)	Eficiencia en perinatal (miles de células/animal)
1	Invención	68,5	263
2	FACS	10	-
3	Kit HB	7,5	250
4	Inmuno-adsorción	2,5	-

Como muestra la tabla 1, la eficiencia del método de la invención es mucho más elevada que la de cualquier otro método descrito hasta ahora para la purificación de POs a partir de tejido maduro o adulto. La invención presenta un método casi 7 veces más eficiente que el método del ejemplo 2, casi 10 veces más eficiente que el método del ejemplo 3 y más de 27 veces más eficiente que el método del ejemplo 4.

Otro aspecto de la invención se refiere a la célula obtenida u obtenible mediante el método de la invención, de ahora en adelante denominada “célula de la invención”. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a un cultivo celular derivado de la célula de la invención. Otra realización más preferida se refiere a una línea celular derivada de la célula de la invención. Más preferiblemente, la línea celular se ha inmortalizado mediante transfección génica.

ES 2 375 860 A1

El término “inmortalización” se refiere al proceso de transformación de una célula que consiste en la adquisición de dicha célula de dividirse ilimitadamente en el tiempo, sin sufrir envejecimiento o senescencia.

El término “transfección génica” se refiere a cualquier técnica o procedimiento que permita la integración en una serie de células de un organismo vivo de un gen exógeno, o “transgén”, y que confiere a dichas células una nueva propiedad biológica. Este procedimiento es sobradamente conocido por un experto en la materia, y puede llevarse a cabo mediante vectores virales, mediante métodos químicos o físicos. Preferiblemente, el método de transfección es la infección viral. El transgén o gen exógeno se refiere a un ADN normalmente no residente, ni presente en la célula que se pretende transformar. En el caso particular de la presente invención el ADN codifica para un gen de inmortalización celular. Pueden considerarse genes de inmortalización celular, pero sin limitarnos, los genes que codifican para: telomerasa o transcriptasa reversa de la telomerasa, genes myc, o genes virales como SV40T (antígeno T del virus de simio 40), EBV (virus de Epstein-Barr), genes adenovirales, genes del Papilomavirus E6 y E7.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de descubrimiento o *screening* de fármacos que comprende:

- a. establecer un cultivo celular a partir de los POs según la reivindicación 16, o una línea celular según la reivindicación 17,
- b. administrar una sustancia química al cultivo o línea celular de (a),
- c. estudiar el efecto de la sustancia química de (b) en el cultivo celular de (a).

El término “estudiar el efecto de la sustancia química” comprende, pero sin limitarnos, estudiar la supervivencia celular, la viabilidad celular, la muerte celular, el estrés celular, la proliferación celular, la migración celular, la diferenciación celular, o estudios de desmielinización, mielinización o remielinización.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Identificación de POs de ratones adultos (60 días de edad) de la cepa CD-1. Los POs se identificaron con una doble detección inmunocitoquímica contra A2B5 y Olig-2 (A-C) o contra NG2 y A2B5 (D-F). Barra de escala: 5 micras.

Figura 2. Separación por FACS de POs de cerebro adulto de ratones transgénicos plp-GFP. Histogramas de las células sin marcar (A) y teñidas con un anticuerpo anti-A2B5 conjugado con ficoeritrina (PE, del inglés “*phycoeritrin*”) (B). Porcentajes relativos de las distintas poblaciones celulares (GFP⁻/A2B5⁺, GFP⁺/A2B5⁻, GFP⁺/A2B5⁺) sin marcar (C) y teñidas con un anticuerpo anti-A2B5 conjugado con PE (D).

Figura 3. Identificación de POs de corteza cerebral humana. Los POs se identificaron con una doble tinción inmunocitoquímica contra PDGFR α y NG2 (A-C), contra NG2 y A2B5 (D-F) y contra Olig-2 y A2B5 (G-I).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 15 días, 2 meses o 6 meses de edad

Los ratones de cepa CD1 fueron suministrados por Charles River Laboratories. Todo el trabajo se llevó a cabo según las Normativas Española (RD 1201/2005 (BOE 252/34367-91, 2005)) y Europea (86/ 609/ EEC y 2003/65/EC) sobre manejo y uso animal.

Un día antes del cultivo primario se recubren los frascos en los que se sembrarán las células con poli-ornitina a una concentración de 10 mg/l. Antes de sembrar las células se retira la poli-ornitina y se lavan los frascos para eliminar los restos.

ES 2 375 860 A1

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y/o asfixia con CO₂ y los cerebros se extrajeron y se llevaron a una placa con solución salina con calcio y magnesio (HBSS del inglés “Hanks’ Balanced Salt Solution”) en hielo.

5 Para retirar rápidamente las meninges y los plexos coroideos, los cerebros se incubaron en diferentes diluciones de una solución de papaína (SP, compuesta por: papaína 0,9 mg/ml, L-cisteína 0,2 mg/ml, EDTA 0,2 mg/ml en HBSS) a 37°C durante 5 minutos (ver Tabla 2). Los restos de meninges y plexos se terminaron de retirar con pinzas y con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Una vez limpias, las cortezas cerebrales se llevaron a una nueva placa con HBSS en hielo.

10

TABLA 2

15 *Resumen de los tiempos de incubación y las concentraciones enzimáticas preferidas para cada estadio postnatal analizado y número total de POs obtenidos por animal y porcentaje relativo con respecto de la edad estándar: P0 (neonato)*

Estadio	Animales / frasco	1ª digestión	2ª digestión	POs obtenidos	% relativo de POs
P0	3	SP 1:10 5 min	SP 1:10 5min	263.148±6.508	100
P15	5	SP 1:5 5 min	SP 1:5 10 min	123.194±8.774	50
P60	5	SP 1:5 5 min	SP 1:5 15 min	68.444±5.461	25
P180	5	SP 1:5 5 min	SP 1:5 15 min	39.757±4.410	12

30

El tejido fue disociado mecánicamente con la ayuda de unas tijeras y se preincubó durante 5 minutos a 37°C. Los trozos de tejido se incubaron en diferentes diluciones de la solución de papaína arriba descrita pero en HBSS sin calcio ni magnesio. La dilución y el tiempo de incubación empleados para cada edad animal están detallados en la Tabla 2. La digestión enzimática se paró mediante la adición de medio con suero y DNasal (DMEM, del inglés “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, con 10% de suero fetal bovino y 1% de DNasal).

35

Tras disociar mecánicamente el tejido mediante unos 25 pases de micropipeta, la suspensión celular se incubó, durante 5 minutos, a 37°C y posteriormente se centrifugó a 900 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante y los restos de mielina se eliminaron y las células se resuspendieron en medio con suero. La suspensión celular se filtró por una malla de 100 micras y se sembró en un volumen final de 10 ml de medio de POs (DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10 ng/ml de PDGF α y 1% de penicilina y estreptomycin) por cada frasco de 75 cm² de superficie, previamente recubierto con poli-orinitina, como está descrito arriba. La densidad celular de siembra depende de cada estadio. El número de animales necesarios para cada frasco se detalla la Tabla 2.

40

Un día después se cambió la totalidad de medio para evitar la muerte celular. A partir de entonces, el medio se cambió cada dos o tres días.

45

Un mes o 40 días después de la siembra se obtuvo una monocapa de astrocitos con POs sobre ella. Para purificar los POs, los frascos de cultivo se cerraron y se agitaron durante la noche, a 300 rpm y 37°C de temperatura.

50

A la mañana siguiente se recogió el medio con los POs en suspensión y se filtró por una malla de 40 micras, centrifugándose después la suspensión celular a 900 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio de POs y se sembraron en placas petri durante 45 minutos a 37°C para eliminar las células de microglía, que se adhieren rápidamente al sustrato. Transcurrido este tiempo se recogió la suspensión celular, se volvió a filtrar con una malla de 40 micras y se volvió a centrifugar como antes. Las células se resuspendieron y sembraron de nuevo en medio de POs y en placas petri durante otros 30 minutos a 37°C para retirar las células de microglía que pudieran quedar.

55

Este medio enriquecido en POs se recogió y centrifugó como se describe arriba. Las células fueron finalmente resuspendidas en medio BS (Bottenstein-Sato, para 10 ml de medio: 9,6 ml de DMEM, 100 microlitros de SFB, 100 microlitros de L-Glutamina 200 mM, 100 microlitros de Penicilina/Estreptomycin, 60 microlitros de BSA al 5%, 10 microlitros de transferrina 100 mg/ml, 1,86 microlitros de Insulina 50 mg/ml, 1 microlitro de Progesterona 0,62 mg/ml, 1 microlitro de putrescinal 60 mg/ml, 1 microlitro de T3 3 mg/ml, 1 microlitro de T4 4 mg/ml, 1 microlitro de selenito sódico 0,39 ng/ml), contadas y sembradas de distinta forma para el estudio bien de proliferación, de migración o de diferenciación hacia oligodendrocitos maduros (Bribián y cols, 2006, Mol Cell Neurosci. 33(1):2-14; Merchán y cols., 2007, Mol Cell Neurosci. 36(3):355-68, Bribián y cols., 2008, Dev Neurobiol. 68(13):1503-16).

60

65

ES 2 375 860 A1

Ejemplo 2

Purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 2 meses de edad mediante FACS

5 La separación celular por activación de fluorescencia se llevó a cabo con ratones transgénicos *plp*-GFP (Spassky *et al*, 1998; Bribián *et al*, 2006, Merchán *et al*, 2007).

10 Los animales se sacrificaron como en el ejemplo 1 y los cerebros se extrajeron de la misma manera. Las meninges y los plexos coroideos se retiraron como en el ejemplo 1 y las cortezas cerebrales se disecaron mecánicamente con el “*Neural Tissue Dissociation Kit*” de Miltenyi Biotec, según las instrucciones del fabricante.

Los restos de mielina se eliminaron mediante una filtración de la suspensión celular a través de una malla de 40 micras seguida de una centrifugación en sacarosa (0,9 M) en HBSS en hielo.

15 Las células se tiñeron con anticuerpo anti-A2B5 conjugado con PE y se analizaron y separaron en un equipo FACSaria de BD. Las células se separaron en HBSS con 2% de suero fetal bovino, 25 mM HEPES y 5 mM EDTA.

20 Como muestra la Figura 2, en el cerebro de ratones adultos (2 meses de edad) hay un porcentaje muy bajo (en torno al 2%) de células doble positivas para GFP (*plp*) y A2B5. Además, el proceso de separación provoca una muerte masiva de células, ya que sólo alrededor del 50% de las células analizadas sobreviven 24 horas después de la separación.

La purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 2 meses de edad mediante FACS tiene un rendimiento final de 10.000 POs por cada animal utilizado.

25 Ejemplo 3

Purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 2 meses de edad mediante el “Oligodendrocyte Selection Kit” de HB

30 Es importante puntualizar que este kit está descrito por el fabricante para la obtención de oligodendrocitos inmaduros con fenotipo $O4^+/GalC^-$ a partir de cerebros de rata o ratón P3, es decir, de 3 días de edad, lo que anteriormente hemos llamado estadio perinatal.

35 Los animales se sacrificaron como en el ejemplo 1 y los cerebros se extrajeron de la misma manera. Posteriormente, se siguieron las instrucciones del fabricante detalladas en el manual del usuario.

40 A pesar de haber introducido el paso de digestión enzimática de las meninges (ver arriba) para minimizar la muerte celular, este método (“*Oligodendrocyte Selection Kit*”) resultó casi 10 veces menos eficaz que el descrito en el Ejemplo 1, con un rendimiento final de 7.500 POs por animal adulto.

Ejemplo 4

Purificación de POs de nervio óptico de rata adulta mediante la técnica de inmuno-adsorción (del inglés, “immuno-panning”)

50 Este método está descrito en la solicitud de patente PCT/US1996/013279 y consiste en la purificación de los POs de nervio óptico de rata adulta a partir de una suspensión mixta de células del nervio óptico. Esta suspensión celular se pone en contacto primeramente con una placa donde previamente se ha absorbido un anticuerpo anti-Thy1, lo que permite la retirada de células de origen no glial. La suspensión celular se pone entonces en contacto con una segunda placa previamente adsorbida con anticuerpo anti-A2B5, anticuerpo anti-NG2 o con aglutinina de cacahuete, que va a permitir que sólo las células con estas proteínas en su superficie queden adsorbidas a la placa. Estas células serán en su mayoría POs aunque, en el caso de A2B5, podrán ser también precursores O-2A.

55 La eficiencia de este método es aproximadamente de 2.500 POs por cada animal (1.250 POs por nervio óptico; WO/1997/007200; Shi y cols, 1998), lo cual es enormemente inferior (30 veces) a la del método de la invención (Tabla 1).

60 Ejemplo 5

Purificación de POs de corteza cerebral humana a partir de biopsias (márgenes de resección en traumatismos y tumores)

65 Para la obtención de POs humanos se siguió el protocolo descrito en el ejemplo 1 con las siguientes modificaciones:

- a. Para la siembra de cada frasco de 25 cm² se empleó una cantidad de tejido de entre 1 y 4 gramos, encontrando los mejores resultados empleando 4 gramos.

ES 2 375 860 A1

- b. La digestión enzimática de las meninges y los plexos coroideos se realizó empleando la solución de papaína (SP) a una dilución de 1:2,5, durante 10 minutos.
- c. El volumen de medio de POs fue de 5 ml por frasco de 25 cm².
- d. La agitación para separar los POs se realizó a 250 rpm.

La eficiencia de este método es de 60.000 células POs por cada gramo de tejido fresco utilizado.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 375 860 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de obtención de POs a partir de la corteza cerebral de un mamífero de edad superior a una semana, que comprende:
- a) obtener una muestra aislada de cerebro,
 - b) seleccionar las POs de la muestra biológica obtenida en (a) y
 - 10 c) cultivar las POs en condiciones de proliferación, migración, movilidad o diferenciación celular.
- 15 2. El método según la reivindicación anterior donde el paso (b) comprende la digestión enzimática de la muestra obtenida según (a).
3. El método según la reivindicación 2 donde el paso (b) comprende:
- i. una primera digestión enzimática de la muestra obtenida según (a),
 - 20 ii. retirar las meninges y los plexos coroideos,
 - iii. disociar mecánicamente el tejido nervioso resultante del paso (ii), y
 - 25 iv. disociar enzimáticamente el tejido nervioso resultante del paso (iii).
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-3 donde la enzima empleada para la digestión enzimática del paso (b) es la papaína.
- 30 5. El método según la reivindicación 4 donde la concentración de papaína empleada en el paso (b) es de entre 50 y 200 microgramos/mililitro.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 150 y 200 microgramos/mililitro.
- 35 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 50 y 120 microgramos/mililitro.
- 40 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 70 y 100 microgramos/mililitro.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (b) es de entre 2 y 22 minutos.
- 45 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (i) es de entre 3 y 7 minutos.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (iv) es de entre 8 y 18 minutos.
- 50 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el paso (b) comprende una digestión enzimática con DNasa.
- 55 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el mamífero tiene más de dos semanas de edad.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el mamífero tiene entre 15 días y 9 meses de edad.
- 60 15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el mamífero tiene entre 15 días y 6 meses de edad.
16. POs obtenibles por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1- 15.
- 65 17. Una línea celular de POs obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, o por la inmortalización celular mediante transfección génica de los POs de la reivindicación 16.

ES 2 375 860 A1

18. Método de descubrimiento de fármacos que comprende:

- a. establecer un cultivo celular a partir de los POs, según la reivindicación 16, o una línea celular de POs, según la reivindicación 17,
- b. administrar una sustancia química al cultivo o línea celular de (a),
- c. estudiar el efecto de la sustancia química de (b) en el cultivo celular de (a).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

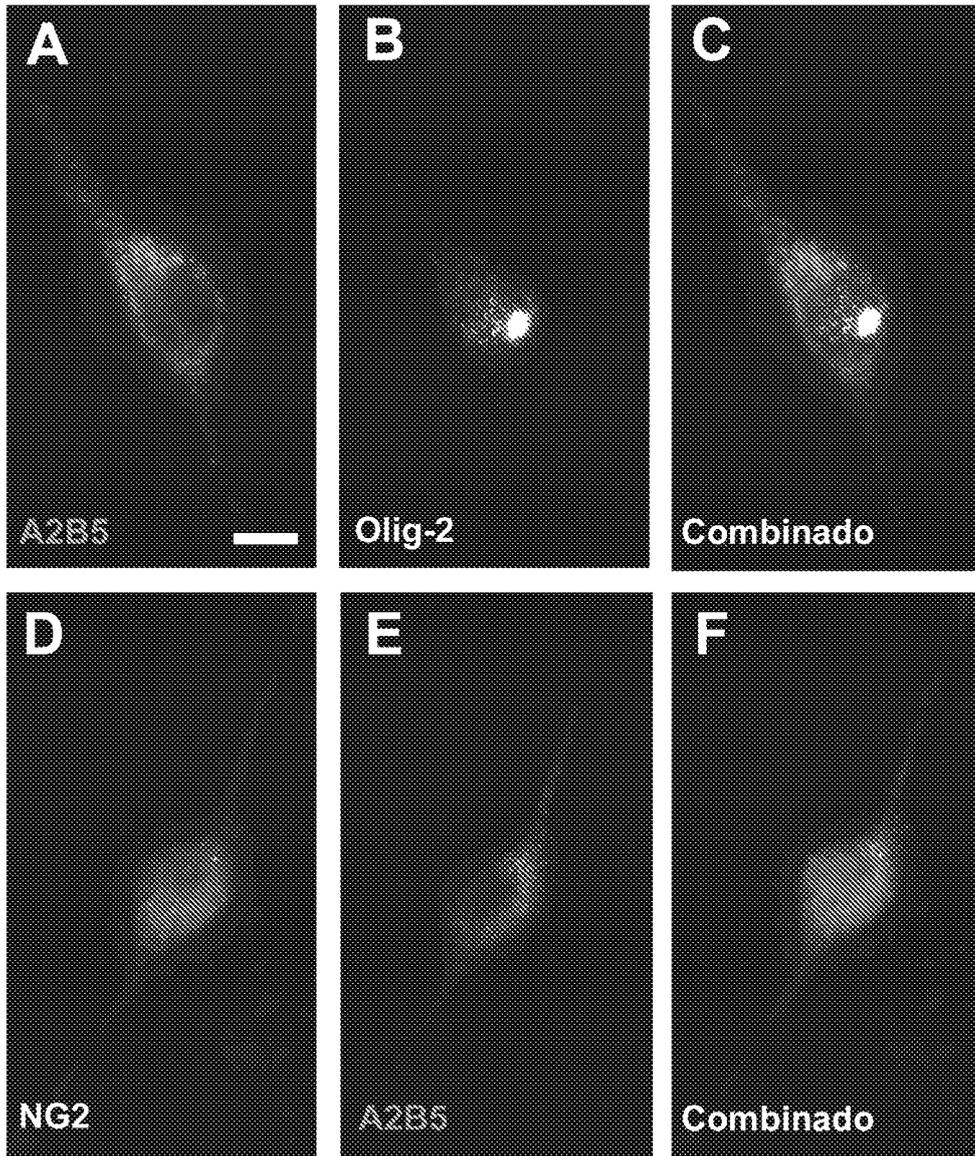


FIG.1

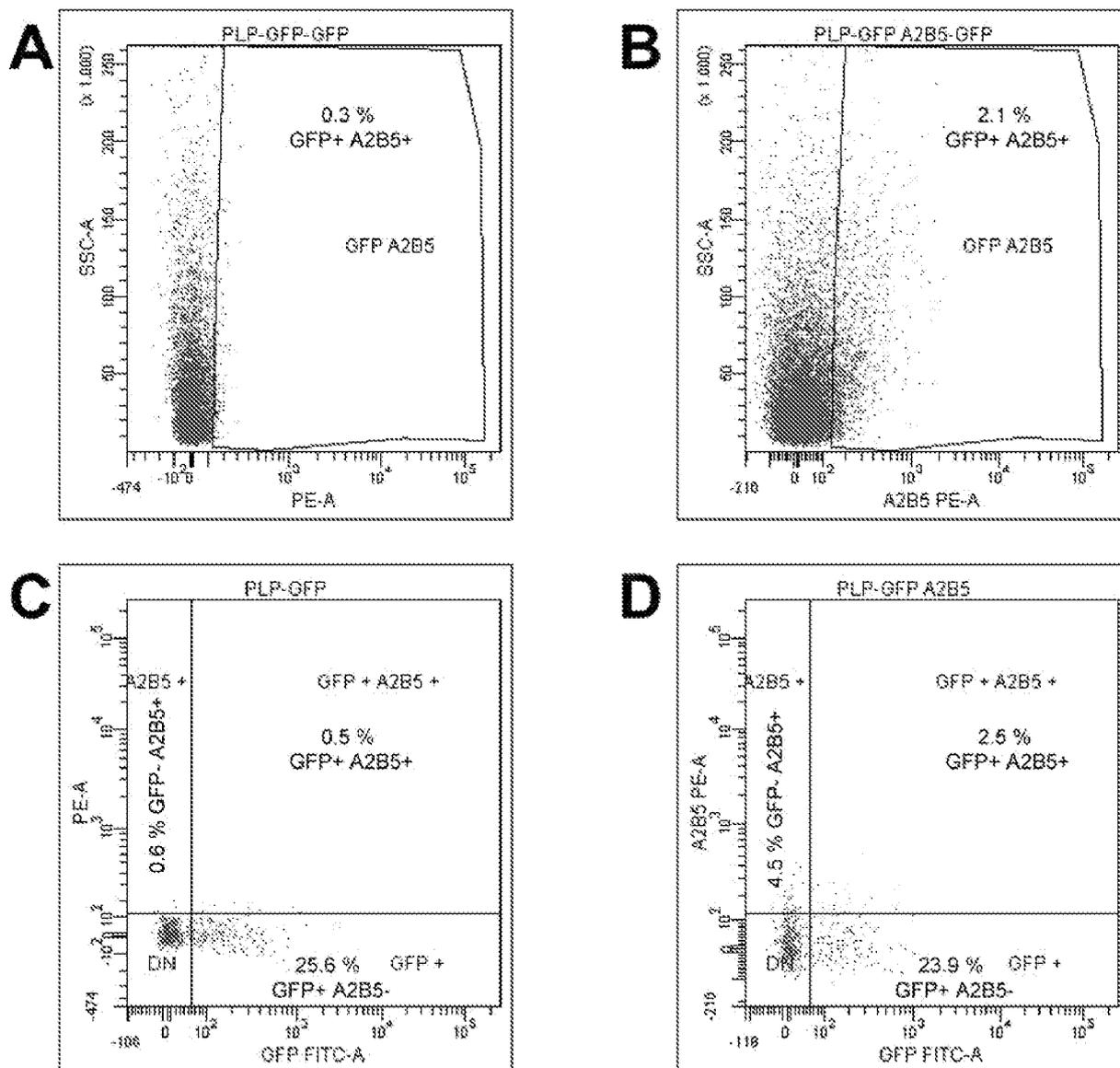


FIG. 2

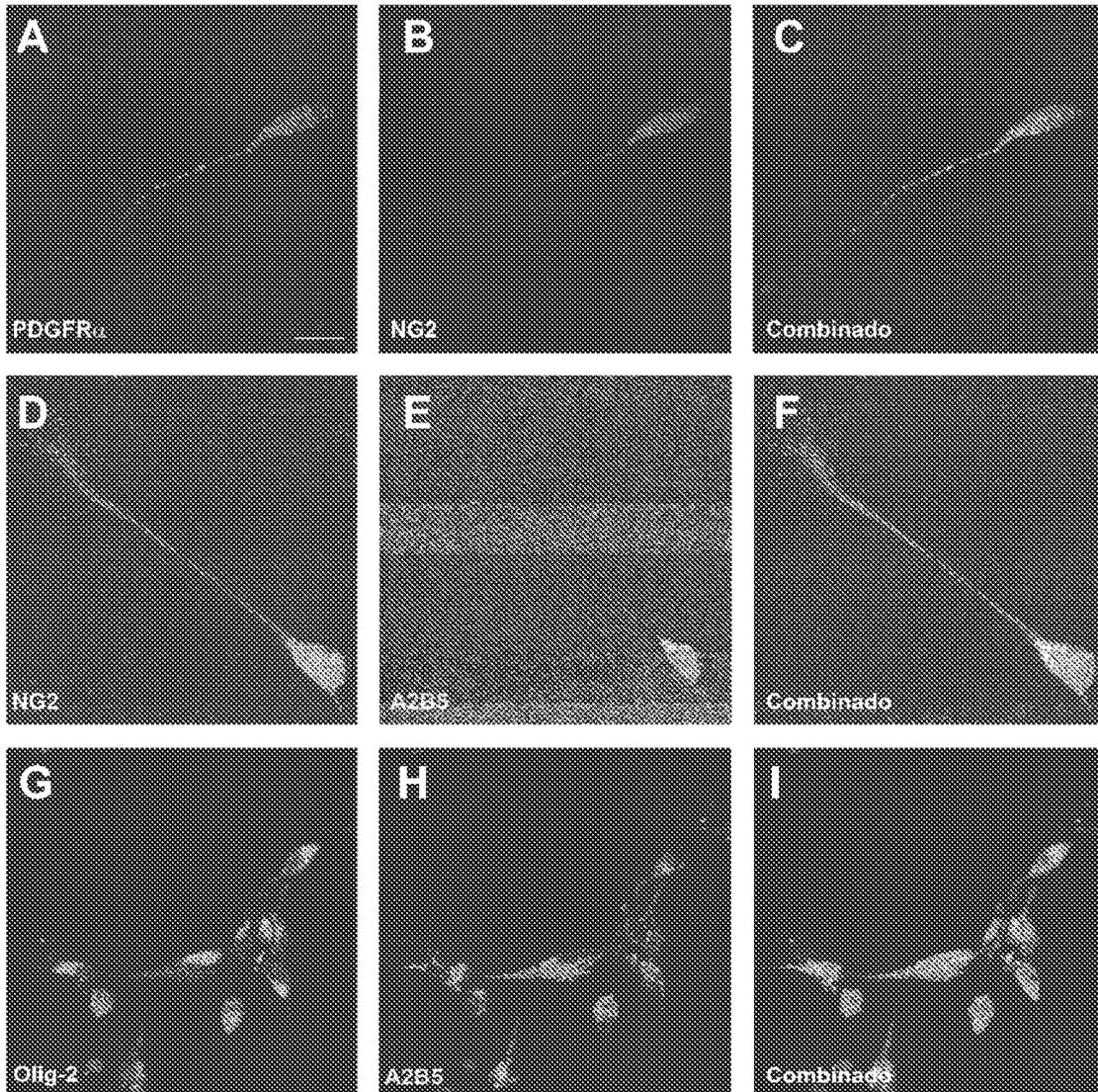


FIG.3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201030493

②² Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N5/0797** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LAGARDE, W, <i>et al.</i> A non-transformed oligodendrocyte precursor cell line, OL-1, facilitates studies of insulin-like growth factor-I signaling during oligodendrocyte development. International journal of developmental neuroscience. Abril 2007. Vol. 25, nº 2, páginas 65-105. ISSN 0736-5748 (Impreso). doi:10.1016/j.ijdevneu.2006.12.006. Ver apartados 2.1.2. y 2.1.2. de "Procedimientos experimentales" (página 96, columna 2, y página 97, columna1, párrafo 1).	1,2,4-18
X	WO 2005046610 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.) 26.05.2005, resumen; ejemplos 1,13.	1,2,4-18
X	ROY, N. S., <i>et al.</i> Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. Journal of Neuroscience. 15.11.1999. Vol. 19, nº 22, páginas 9986-9995. ISSN 0270-6474 (Impreso). Ver apartado 2 de "Materiales y Métodos" y Figura 4.	1,2,4-18
X	US 2006183147 A1 (MEYER-FRANKE, A.) 17.08.2006, párrafo [0169].	1,2,4-18
X	PAN, H-C, <i>et al.</i> Enhanced regeneration in spinal cord injury by concomitant treatment with granulocyte colony-stimulating factor and neuronal stem cells. Journal of clinical neuroscience. Junio 2008. Vol. 15, nº 6, páginas 656-664. ISSN 0967-5868 (Impreso). doi:10.1016/j.jocn.2007.03.020. Ver apartado 1 de "Materiales y Métodos".	1,2,4-18
X	CACCI, E., <i>et al.</i> Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line. Experimental cell research. 01.02.2007. Vol. 313, nº 3, páginas 588-601. ISSN 0014-4827 (Impreso). doi:10.1016/j.yexcr.2006.11.001. Ver apartado 1 de "Materiales y Métodos".	1,2,4-18
X	VILLA, A., <i>et al.</i> Generation and properties of a new human ventral mesencephalic neural stem cell line. Experimental cell Research. 01.07.2009. Vol. 315, nº 11, páginas 1860-1874. ISSN 0014-4827. doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.011. Ver apartado 2 de "Materiales y Métodos".	1,2,4-18
X	US 2006172415 A1 (OKAZAKI, H.) 03.08.2006, ejemplo 2 (párrafo [0102]).	1,2,4-18

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

17.02.2012

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201030493

②² Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N5/0797** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PALMER, T.D., <i>et al.</i> The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. <i>Molecular and cellular neurosciences</i> . 1997. Vol. 8, nº 6, páginas 389-404. ISSN 1044-7431 (Impreso). doi:10.1006/mcne.1996.0595. Ver resumen y apartado 1 de "Métodos experimentales".	1,2,4-18
X	CHEN, Y., <i>et al.</i> Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. <i>Nature protocols</i> . 2007. Vol. 2, nº 5, páginas 1044-1051. ISSN 1750-2799 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente resumen y Protocolo A (página 1046).	1,2,9-18

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
17.02.2012

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
2/6

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)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 4-18	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	LAGARDE, W, <i>et al.</i> International journal of developmental neuroscience. Abril 2007. Vol. 25, nº 2, páginas 65-105. ISSN 0736-5748 (Impreso). doi:10.1016/j.ijdevneu.2006.12.006.	Abril 2007
D02	WO 2005046610 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.)	26.05.2005
D03	ROY, N. S., <i>et al.</i> Journal of Neuroscience. 15.11.1999. Vol. 19, nº 22, páginas 9986-9995. ISSN 0270-6474 (Impreso).	15.11.1999
D04	US 2006183147 A1 (MEYER-FRANKE, A.)	17.08.2006
D05	PAN, H-C, <i>et al.</i> Journal of clinical neuroscience. Junio 2008. Vol. 15, nº 6, páginas 656-664. ISSN 0967-5868 (Impreso). doi:10.1016/j.jocn.2007.03.020.	Junio 2008
D06	CACCI, E., <i>et al.</i> Experimental cell research. 01.02.2007. Vol. 313, nº 3, páginas 588-601. ISSN 0014-4827 (Impreso). doi:10.1016/j.yexcr.2006.11.001 .	01.02.2007
D07	VILLA, A., <i>et al.</i> Experimental cell Research. 01.07.2009. Vol. 315, nº 11, páginas 1860-1874. ISSN 0014-4827. doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.011.	01.07.2009
D08	US 2006172415 A1 (OKAZAKI, H.)	03.08.2006
D09	PALMER, T.D., <i>et al.</i> 1997. Vol. 8, nº 6, páginas 389-404. ISSN 1044-7431 (Impreso). doi:10.1006/mcne.1996.0595.	1997
D10	CHEN, Y., <i>et al.</i> Nature protocols. 2007. Vol. 2, nº 5, páginas 1044-1051. ISSN 1750-2799 (Electrónico).	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 células precursoras de oligodendrocitos (POs) a partir de muestras de corteza cerebral de mamífero de edad superior a una semana, que comprende una digestión con papaína, un paso de retirada de meninges y plexos coroideos, una disociación mecánica del tejido nervioso resultante, y una segunda digestión con papaína. Además, el procedimiento incluye una digestión con DNasa en la etapa de selección de los precursores de oligodendrocitos.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa el procedimiento de la solicitud tal y como está reivindicado, por lo que la solicitud es nueva según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Se han encontrado numerosos documentos que divulgan procedimientos similares al de la invención, aunque en ninguno de ellos se realiza una digestión enzimática del tejido cerebral antes de retirar las meninges y los plexos coroideos. Puesto que el solicitante hace constar que esa etapa facilita el aislamiento de los POs, se considera que la reivindicación 3 de la solicitud cumple el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes. El resto de las reivindicaciones, sin embargo, sí estarían afectadas por los documentos del estado de la técnica, por lo que no cumplirían este requisito de actividad inventiva.

Así, el documento D01 describe el aislamiento de células precursoras de oligodendrocitos a partir de cerebro de ratas de 1-2 días de edad mediante un método similar al de la invención, en el que se retiran del cerebro las meninges, el cerebelo y el bulbo olfatorio, y que comprende la utilización de las enzimas papaína y DNasa, y la disociación mecánica del tejido durante la digestión. A diferencia del método de la invención, en el procedimiento de D01 la retirada de las meninges se hace en un paso anterior a la digestión enzimática, por lo que este documento no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud. En cuanto al resto de las diferencias entre estos dos procedimientos, relativas a la edad del mamífero del que se toma la muestra, la concentración de la enzima, y el tiempo de digestión, no se consideran relevantes a efectos de actividad inventiva, pues en el estado de la técnica se emplean procedimientos similares para aislar POs de muestras de mamíferos de diferentes edades, se utilizan muy variadas concentraciones de papaína, y los tiempos de digestión son también muy diferentes en los distintos casos, como se puede ver, por ejemplo, en los documentos citados en este informe.

Por tanto, el mero hecho de que las muestras de cerebro provengan de mamíferos de 2 días en lugar de 1 ó 2 semanas, 6 ó 9 meses, no aporta actividad inventiva a la solicitud, como tampoco lo hace el utilizar las concentraciones de papaína y tiempos de digestión concretos que se reivindican, pues no aportan una ventaja sustancial a la invención respecto de los utilizados en el estado de la técnica. En consecuencia, las reivindicaciones 1, 2 y 4-15, no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Por otra parte, la reivindicación 16, relativa a las células POs obtenidas con este método, tampoco tiene actividad inventiva, pues se trata de células cuya característica técnica es su capacidad de generar oligodendrocitos, ampliamente representada en el estado de la técnica. En consecuencia, las reivindicaciones 17 y 18, correspondientes a la línea celular generada a partir de las células, y al método de descubrimiento de fármacos que emplea las células o la línea celular, tampoco tendrían actividad inventiva.

En el ejemplo 1 del documento D02 y en el documento D03 se aíslan células POs de cerebro humano adulto de diferentes edades mediante métodos similares al reivindicado en la presente solicitud. En ambos casos, las células se aíslan a partir de la sustancia blanca del cerebro, en lugar de la corteza cerebral; puesto que el mismo solicitante indica en la descripción que los POs se distribuyen de manera homogénea por todo el SNC y que, aunque están principalmente en la sustancia blanca, también se encuentran en la sustancia gris, resultaría evidente para el experto en la materia aplicar el método divulgado en los documentos D02 y D03 para aislar POs de cualquiera de las partes del cerebro, incluyendo, por tanto, la corteza cerebral. Como se ha explicado para el documento D01, con excepción de la retirada de las meninges tras la primera digestión enzimática, el resto de las diferencias entre la solicitud y los documentos D02 y D03 en cuanto a la edad del mamífero del que se obtiene la muestra, la concentración de la enzima, o los tiempos de digestión, no aportan actividad inventiva a la solicitud, por lo que la reivindicación 3 cumpliría el requisito del artículo 8 de la Ley de Patentes, pero el resto de las reivindicaciones no tendrían actividad inventiva.

En los documentos D04 a D06, se emplean procedimientos muy semejantes al de la solicitud (basados en digestión con papaína y DNasa), para aislar POs de muestras de corteza cerebral de distintos orígenes (ratas de 1 ó 2 días de edad en el caso de D04, fetos de rata en D05; fetos humanos en D06). En D07 y en D08, las células se aíslan de distintas partes del cerebro de fetos humanos, y en D09, del hipocampo de ratas adultas. Por los argumentos dados anteriormente en este informe, cualquiera de estos documentos afectaría la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 2 y 4 a 18 de la presente solicitud.

Finalmente, se cita el documento D10, ya que contiene protocolos de aislamiento de células POs de diferentes orígenes, incluyendo corteza cerebral de rata neonatal (1-2 días de edad), en el Protocolo A. Puesto que en el método descrito en D10 no se incluye ninguna etapa de digestión con papaína, este documento afectaría la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 2 y 9 a 18 de la solicitud, pero no la de las reivindicaciones 3 a 8.