

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 287**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2016 PCT/CN2016/094529**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17032224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16838484 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3339427**

54 Título: **Método de preparación para células envoltantes olfativas**

30 Prioridad:

21.08.2015 CN 201510516055

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

22.10.2024

73 Titular/es:

BEIJING HONGTIANJI NEUROSCIENCE

ACADEMY (100.0%)

A-821, Shoute Venture Base, Gucheng Street,

Shijingshan District

Beijing 100043, CN

72 Inventor/es:

GAO, WENYONG;

XIAO, JUAN y

HUANG, HONGYUN

74 Agente/Representante:

CALLE LÓPEZ, Alejandro

Observaciones:

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

ES 2 983 287 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de preparación para células envoltentes olfativas

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de la tecnología de cultivo celular y se refiere a un método de preparación para células envoltentes olfativas que comprende el aislamiento, los pases, la criopreservación y la diferenciación de las células envoltentes olfativas, y a la formulación de los reactivos necesarios.

10

Antecedentes de la técnica

Las células envoltentes olfativas (OEC, por sus siglas en inglés), originadas en el epitelio olfativo, están dispersas en los bulbos olfativos y la mucosa olfativa, véase Guo, Xin *et al.*: "*Comparison of Growth of Human Olfactory Epithelium Ensheathing Cells in Different Culture Conditions*", *Zhejiang Clinical Medical Journal*, vol. 16, n.º 9, 30 de septiembre de 2014 (30-09-2014), página 1366. Las neuronas olfativas primitivas, junto con una gran cantidad de células placoda, migran desde los axones eferentes de la mucosa olfativa hacia las vesículas telencefálicas, y las células envoltentes olfativas guían los axones neuronales olfativos para llegar a las vesículas telencefálicas. Estas células forman bulbos olfativos tempranos que después se evierten, y las células migradas cubren sus superficies para formar una capa delgada y después penetran en la glía limitante, dando como resultado la creación de la capa nerviosa olfativa y la capa glomerular, que se convierten en una nueva glía limitante que cubre las superficies de los bulbos olfativos. Las células envoltentes olfativas en un adulto aún pueden migrar a través de la barrera de la glía limitante entre los nervios periféricos y los nervios centrales. En los bulbos olfativos, las células envoltentes olfativas son las únicas células gliales que entran en contacto y rodean los axones neuronales olfativos. A lo largo de toda la vía del sistema nervioso central, las células envoltentes olfativas rodean los axones neuronales olfativos para evitar su contacto con las células de otros sistemas nerviosos centrales. Las OEC puede secretar factores neurotróficos y sustancias para estimular el crecimiento de los axones, que puede promover la regeneración axonal y facilitar la mielinización. Como un tipo de células gliales especiales que tienen funciones similares a las de las células de Schwann y los oligodendrocitos, las OEC tienen efectos nutritivos, protegiendo, regulando o estimulando los nervios, promoviendo la mielinización y la regeneración de axones, inhibiendo la hiperplasia glial y la formación de cicatrices, y otros efectos reparadores sobre el sistema nervioso. Estas propiedades de las células envoltentes olfativas proporcionan un buen entorno interno para el restablecimiento y la reconstrucción funcional y estructural de los nervios dañados o degenerativos. Las propiedades de las células envoltentes olfativas las convierten en la opción óptima para el neurorestablecimiento. Los artículos publicados con respecto al trasplante de las células envoltentes olfativas también han demostrado poderosamente que las células envoltentes olfativas son las mejores células para el neurorestablecimiento. Sin embargo, el método de preparación existente para células envoltentes olfativas comprende: tomar tejidos del bulbo olfativo en el cerebro de fetos abortados de 3-5 meses, cultivarlos directamente con una determinada cantidad de suero animal y después usar una determinada cantidad de citarabina, métodos físicos o agentes químicos para inhibir o reducir fibroblastos con el fin de conseguir el fin de purificar células envoltentes olfativas. El uso de una solución de criopreservación para células envoltentes olfativas que se fabrican mezclando suero animal en una alta concentración con DMSO da como resultado muchas desventajas:

1. factores éticos: el uso de los tejidos del bulbo olfativo que derivan de fetos abortados puede estar limitado por motivos éticos;
2. menor pureza celular: (1) la citarabina y los reactivos químicos, que son citostáticos de amplio espectro, inhiben las células envoltentes olfativas inhibiendo al mismo tiempo el crecimiento de fibroblastos, y sus cantidades son difíciles de determinar; (2) los métodos físicos dan como resultado la pérdida de un gran número de células envoltentes olfativas cuando se eliminan los fibroblastos; (3) los fibroblastos crecen más rápido y más fácilmente cuando se usa un medio de cultivo que contiene suero;
3. imposibilidad de cultivo de pases continuos: (1) la citarabina y los reactivos químicos, como citostáticos de amplio espectro, afectan a los números de pases de las células envoltentes olfativas; (2) cuando se usa suero como medio básico, las células envoltentes olfativas son fáciles de diferenciar de forma no direccional y los fibroblastos crecen rápidamente y es difícil mantener las características biológicas después de múltiples pases;
4. existencia de riesgos potenciales: las muestras de suero y tejido alógeno son susceptibles a infecciones víricas y bacterianas y propensas a provocar rechazos, alergias u otros peligros desconocidos.

Jiang, Xiaorong *et al.*: "*Isolation, Culture and Purification of Olfactory Ensheathing Cells from Human Fetal Olfactory Mucosa*", *Proceedings of the 5th Annual Conference of International Association of Neurorestoratology, the 9th Annual Conference of Global College of Neuroprotection and Neuroregeneration & the 4th International Spinal Cord Injury Treatments and Trials Symp*, 31 de diciembre de 2012 (31-12-2012) describe un método para obtener células envoltentes olfativas de la mucosa olfativa fetal humana mediante cultivo celular para la adhesión selectiva en presencia de neurotrofina-3 (NT3) y suero de baja concentración.

A partir de CN105062956A se conoce un protocolo de cultivo para células envoltentes olfativas.

65

El cultivo de las células envoltentes olfativas de la mucosa olfativa en un medio de cultivo para células envoltentes

que se incuban a 37 °C y CO₂ al 5 % se desvela en Anne Mayeur *et al.*: "*Potential of Olfactory Ensheathing Cells from Different Sources for Spinal Cord Repair*", *Plos One*, vol. 8, n.º 4, 24 de abril de 2013 (24-04-2013), página e62860, XP055526934.

- 5 E. Au *et al.*: "*SPARC from Olfactory Ensheathing Cells Stimulates Schwann Cells to Promote Neurite Outgrowth and Enhances Spinal Cord Repair*", *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, n.º 27, 4 de julio de 2007 (04-07-2007), páginas 7208-7221, XP055527352, desvela la generación de medios acondicionados a partir de células envoltentes olfativas.

Contenido de la invención

10 Para resolver los problemas mencionados anteriormente existentes en la técnica anterior, el objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación que pueda obtener un gran número de células envoltentes olfativas activas de forma rápida y conveniente, proporcionando de este modo una fuente suficiente de células envoltentes olfativas para el tratamiento de neurorestablecimiento clínico.

15 Las soluciones técnicas utilizadas para realizar los objetos anteriores son las siguientes:
Un método de preparación para células envoltentes olfativas, que comprende las siguientes etapas:

20 (1) cultivar células envoltentes olfativas individuales derivadas de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio en un medio de cultivo para células envoltentes olfativas en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %, y permitir que las células crezcan de forma adherente, el medio de cultivo para células envoltentes olfativas es DMEM/DF12 (Gibco) como medio de cultivo básico, complementado con factores neurotróficos que comprenden EGF 20-60 ng/ml, FGF 20-80 ng/ml, 1-2 ml de N2 (100×), 2-3 ml de B27 (50×) y T3 (Sigma) 0,1 µg/ml en concentraciones finales;

25 (2) recoger y filtrar un sobrenadante de cultivo obtenido en la etapa (1) cuando las células crecen de forma adherente a aproximadamente el 90 % para obtener un sobrenadante de cultivo celular filtrado, mezclar el sobrenadante de cultivo celular filtrado con el medio de cultivo para células envoltentes olfativas en una relación de 1:3 para formular un medio de cultivo para hacer pases, mezclar las células obtenidas filtrando el sobrenadante de cultivo obtenido en la etapa (1) con el medio de cultivo para hacer pases, cultivarlas en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %, y permitirles crecer de forma adherente.

Preferentemente, las células envoltentes olfativas son células envoltentes olfativas derivadas de mucosa olfativa humana.

35 Preferentemente, el medio de cultivo para células envoltentes olfativas derivadas de mucosa olfativa humana es DMEM/DF 12 (Gibco), complementado con factores neurotróficos que comprenden EGF (Pepro Tech) 20 ng/ml, (Pepro Tech)FGF 20 ng/ml, (Gibco) N2 al 1 %, B27 (Gibco) al 2 % y T3 (Sigma).

40 Preferentemente, el método de preparación para células envoltentes olfativas individuales comprende la siguiente etapa:
digerir bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio con una enzima para obtener células individuales.

45 Más preferentemente, el método de preparación para células envoltentes olfativas individuales comprende la siguiente etapa:
digerir bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio con Colagenasa I y una proteasa neutra para obtener células individuales.

Preferentemente, la proteasa neutra es Dispasa II para tejidos.

50 Más preferentemente, el método de preparación para células envoltentes olfativas individuales comprende la siguiente etapa:
digerir bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio en un tamaño de 1 mm³ con Colagenasa I y una proteasa neutra en baño de agua a 37 °C con vibración, para obtener células individuales, en donde la relación en volumen de la colagenasa y la proteasa neutra y los bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio es de 2:1.

Preferentemente, la Colagenasa I se usa a una concentración del 0,1 % y la proteasa neutra se usa a una concentración del 0,2 %.

60 Además, preferentemente, los bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio se lavan antes de la digestión para eliminar la sangre residual de la superficie; aún más preferentemente, la sangre residual en la superficie se elimina mediante una solución de penicilina y suero fisiológico en una relación de 1:1; incluso más preferentemente, la mucosa olfativa limpia se corta en bloques de tejido de un tamaño de 1 mm³ con unas tijeras esterilizadas en una placa de cultivo.

Preferentemente, la densidad de inoculación del cultivo en la etapa (1) es de 1×10^4 células/ml.

Preferentemente, la densidad de inoculación del cultivo en la etapa (2) es de 1×10^4 células/ml.

- 5 Preferentemente, el método de preparación comprende además las etapas de pases o criopreservación de las células envolventes olfativas.

Preferentemente, el método de preparación comprende además una etapa de criopreservación de las células envolventes olfativas; preferentemente, la criopreservación es la criopreservación a una temperatura ultrabaja; preferentemente, la criopreservación de las células envolventes olfativas a temperatura ultrabaja comprende las siguientes etapas: filtrar el sobrenadante de cultivo cuando las células en la etapa (2) crecen de manera adherente al 90 %, y preparar un medio de criopreservación para células envolventes olfativas a partir del sobrenadante de cultivo para la criopreservación. Más preferentemente, el medio de criopreservación para las células envolventes olfativas consiste en el suero autólogo, el sobrenadante de cultivo, DMEM/F12 y DMSO. Además, preferentemente, el medio de criopreservación para las células envolventes olfativas consiste en el suero autólogo, el sobrenadante de cultivo, DMEM/F12 y DMSO en una relación en volumen de 5:2:2:1.

Preferentemente, el método de preparación comprende además una etapa de cultivo de diferenciación de las células envolventes olfativas; preferentemente, la etapa de cultivo de diferenciación de las células envolventes olfativas comprende añadir un medio de cultivo para la diferenciación de las células gliales a las células envolventes olfativas para el cultivo de diferenciación. Más preferentemente, el medio de cultivo para la diferenciación de las células gliales consiste en un medio de cultivo para células envolventes olfativas y el suero autólogo en una relación en volumen de 87:13.

- 25 En un ejemplo específico, el método de preparación puede consistir en las siguientes etapas:

Etapa 1. formular un medio de cultivo para células envolventes olfativas con factores neurotróficos;
 Etapa 2. recogida de tejidos: sujetar una cantidad adecuada de los tejidos de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio con anestesia local;
 30 Etapa 3. pretratamiento de bloques de tejido: lavar la sangre residual en las superficies de los bloques de tejido sujetados y procesar los bloques de tejido en bloques de un tamaño de 1 mm^3 ;
 Etapa 4. digestión con una combinación de dos enzimas: recoger los bloques de tejido picados con tijeras, añadir 2 volúmenes de Colagenasa I y una proteasa neutra y digerir en baño de agua a 37°C con vibración;
 35 Etapa 5. cultivo primario: recoger células individuales obtenidas mediante la digestión y colocarlas en un tubo de centrifuga, mezclar bien con un medio de cultivo para células envolventes olfativas, después inocular en un matraz de cultivo celular y cultivar en una incubadora a 37°C y CO_2 al 5 %;
 Etapa 6. cultivo por pases: recoger y filtrar el sobrenadante de cultivo de la célula de la que se han de hacer pases cuando las células crecen de forma adherente a aproximadamente el 90 %, y mezclarlo con un medio de cultivo para células envolventes olfativas en una relación de 1:3, para formular un medio de cultivo para el presente pase.
 40 Etapa 7. criopreservación a una temperatura ultrabaja: recoger y filtrar el sobrenadante de las células que se han de criopreservar cuando las células crecen de forma adherente a aproximadamente el 90 %, para formular un medio de criopreservación específico para células envolventes olfativas (que comprende el suero autólogo, el sobrenadante de cultivo celular, DMEM/F12 y DMSO); y criopreservar de acuerdo con los procedimientos habituales;
 45 Etapa 8. cultivo de diferenciación: añadir un medio de cultivo formulado para la diferenciación de células gliales (un medio de cultivo para células envolventes olfativas: el suero autólogo = 87: 13) y cultivo de diferenciación de acuerdo con los procedimientos habituales.

El método de preparación de la presente invención implica la recogida de tejidos, la digestión mediante una combinación de dos enzimas, el cultivo por pases, la criopreservación a una temperatura ultrabaja, el cultivo de diferenciación y la formulación de los reactivos requeridos. Las ventajas de la presente invención son que el método proporcionado para extraer y cultivar células envolventes olfativas puede obtener rápidamente una gran cantidad de células envolventes olfativas y mantener la capacidad proliferativa de las células envolventes olfativas durante un largo tiempo, y las células obtenidas después del 11.º pase todavía tienen las actividades de las células envolventes olfativas, como se muestra en las figuras. La Fig. 1 muestra que las células adherentes tienen forma de huso, con protuberancias alargadas bipolares, protuberancias alargadas tripolares o polígono, observadas con un microscopio invertido ordinario, aumento: $10 \times / 0,25$. La Fig. 2 muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica de las células envolventes olfativas bajo un microscopio confocal, en donde (A) muestra fluorescencia verde, tinción inmunocitoquímica para S100; (B) muestra fluorescencia roja, tinción inmunocitoquímica para p75 (L-NGFR); (C) muestra fluorescencia azul, estando los núcleos marcados mediante Hoechst; y (D) es un gráfico con fluorescencia de espectro completo; aumento: $20 \times / 0,5$. Las células cultivadas expresan S100 y P75 (L-NGFR) en niveles elevados, que son los marcadores positivos de las células envolventes olfativas.

Breve descripción de los dibujos

65 La Figura 1 muestra los resultados del examen microscópico de las células envolventes olfativas, aumento:

10×/0,25.

La Figura 2 muestra las identificaciones por microscopía confocal de las células envolventes olfativas mediante tinción inmunohistoquímica, aumento: 20×/0,5.

5 Mejores modos para realizar la invención

1. Formulación de un medio de cultivo para células envolventes olfativas

10 Se formuló un medio de cultivo para células envolventes olfativas con DMEM/DF12 (Gibco) como medio de cultivo básico, que se complementó con los factores de cultivo que comprenden EGF 20-60 ng/ml, FGF 20-80 ng/ml, 1-2 ml de N2 (100×), 2-3 ml de B27 (50×) y T3 (Sigma) 0,1 µg/ml en concentraciones finales, después se filtró y se esterilizó en una mesa limpia y se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

15 2. Recogida de tejidos

20 Dos días antes de la adquisición de bloques de tejido, la cavidad nasal se limpió y se confirmó que no estaba infectada. Antes de la adquisición, se realizaron dos operaciones de anestesia local por vía intranasal insertando una lámina de hilo de algodón humedecida con una solución salina fisiológica que contenía tetracaína al 1,2 %-1,5 % en la cavidad nasal con unas pinzas en forma de pistola, cada una de ellas realizada durante 5-10 min; los tejidos de la mucosa olfativa cerca del 1/3 superior y externo de los cornetes superior y medio se tomaron con pinzas para el seno etmoidal y los tejidos obtenidos se colocaron en una placa de vidrio; y después la placa de vidrio se colocó en una hielera, que se devolvió a una sala de cultivo inmediatamente.

25 3. Pretratamiento de tejidos

Después de devolverlos al laboratorio, los bloques de tejido se lavaron con una solución salina fisiológica que contenía penicilina 100 U/ml para eliminar la sangre residual en la superficie de los bloques de tejido mucoso y se cortaron en bloques de un tamaño de 1 mm³ con unas tijeras oftalmológicas esterilizadas en una placa de vidrio.

30 4. Digestión mediante una combinación de dos enzimas

35 Los bloques de tejido picados con tijeras se recogieron, a los que se les añadieron 2 volúmenes de Colagenasa I y una proteasa neutra, y se digirieron en baño de agua a 37 °C con vibración durante 15 min, y después se pipetearon repetidamente con una pipeta que tenía un codo grueso, y se dejaron reposar de forma natural durante 1 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de centrifuga y la digestión finalizó. La operación anterior se repitió 3 veces de manera que los tejidos pudieran digerirse en una suspensión de células individuales. Todas las suspensiones celulares después de la terminación de la digestión se recogieron juntas y se centrifugaron a 1200 r/4 min, se lavaron con DMEM/F12 y se centrifugaron a 1200 r/4 min durante un total de 3 veces.

40 5. Cultivo primario

45 Se añadió un medio de cultivo para células envolventes olfativas para preparar una suspensión de células individuales, que se inoculó en un matraz de cultivo de plástico con una abertura diagonal tratado con poli-L-lisina a una densidad de 1×10^4 células/ml, después se cultivó en una incubadora de temperatura y humedad constantes a 37 °C y CO₂ al 5 %.

6. Cultivo por pases

50 El sobrenadante de cultivo se recogió cuando las células crecieron a aproximadamente el 90 % de confluencia, se filtró con un filtro de 0,22 µm y se mezcló con un medio de cultivo para células envolventes olfativas en una relación de 1:3 para formular el medio de cultivo para el presente pase; las células se recogieron, a las que se les añadió una cantidad adecuada de medio de cultivo para pases para preparar una suspensión celular, después de teñir con azul tripano, las células viables se contaron bajo un microscopio y después se hicieron pases nuevamente, siendo la densidad de las células de las que se hicieron pases 1×10^4 células/cm³.

55 7. Crioconservación a una temperatura ultrabaja

60 El sobrenadante de cultivo se recogió cuando las células crecieron a aproximadamente el 90 % de confluencia, se filtró con un filtro de 0,22 µm para formular un medio de crioconservación específico para células envolventes olfativas (una relación en volumen del suero autólogo: el sobrenadante del cultivo celular: DMEM/F12: DMSO = 5:2:2:1); las células para la crioconservación se recogieron de forma habitual, a lo que se le añadió un crioprotector, y la densidad final de las células se ajustó a 5×10^6 células/ml ~ 5×10^7 células/ml. Las células se almacenaron a 4 °C durante 60 minutos y a -20 °C durante 70 minutos, y se crioconservaron a una temperatura ultrabaja de -80 °C durante la noche antes de colocarlas en un tanque de nitrógeno líquido.

65 8. Cultivo de diferenciación

Se formuló un medio de diferenciación para células gliales (una relación en volumen de un medio de cultivo para células envoltoras olfativas: el suero autólogo = 87: 13) y se conservó a 4 °C para su uso posterior; se añadió el medio de diferenciación formulado para células gliales y se realizó un cultivo de diferenciación de acuerdo con los procedimientos habituales.

Específicamente, la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos anteriores.

10 Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o a métodos de diagnóstico *in vivo* en los ejemplos anteriores han de interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación para células envoltentes olfativas, que comprende las siguientes etapas:

- 5 (1) cultivar células envoltentes olfativas individuales derivadas de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio en un medio de cultivo para células envoltentes olfativas en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % y permitir que las células crezcan de forma adherente, el medio de cultivo para células envoltentes olfativas es DMEM/DF12 (Gibco) como medio de cultivo básico, complementado con factores neurotróficos que comprenden EGF 20-60 ng/ml, FGF 20-80 ng/ml, 1-2 ml de N2 (100×), 2-3 ml de B27 (50×) y T3 (Sigma) 0,1 µg/ml en concentraciones
10 finales;
- (2) recoger y filtrar un sobrenadante de cultivo obtenido en la etapa (1) cuando las células crecen de forma adherente a aproximadamente el 90 % para obtener un sobrenadante de cultivo celular filtrado, mezclar el sobrenadante de cultivo celular filtrado con el medio de cultivo para células envoltentes olfativas en una relación de 1:3 para formular un medio de cultivo para hacer pases, mezclar las células obtenidas filtrando el sobrenadante
15 de cultivo obtenido de la etapa (1) con el medio de cultivo para hacer pases, cultivarlas en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %, y permitir a las células crecer de forma adherente.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células envoltentes olfativas son las células envoltentes olfativas derivadas de mucosa olfativa humana.
20
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el medio de cultivo para células envoltentes olfativas derivadas de mucosa olfativa humana consiste en DMEM/DF 12 (Gibco) y los siguientes factores neurotróficos: EGF (Pepro Tech) 20 ng/ml, FGF (Pepro Tech) 20 ng/ml, N2 (Gibco) al 1 %, B27 (Gibco) al 2 % y T3 (Sigma).
25
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el método de preparación para células envoltentes olfativas individuales comprende la siguiente etapa: digerir bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio con una enzima para obtener células individuales.
30
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el método de preparación para células envoltentes olfativas individuales comprende la siguiente etapa: digerir bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio con Colagenasa I y una proteasa neutra para obtener células individuales.
35
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la proteasa neutra es Dispasa II para tejidos.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el método de preparación para células envoltentes olfativas individuales comprende la siguiente etapa: digerir bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio en un tamaño de 1 mm³ con Colagenasa I y una proteasa neutra en baño de agua a 37 °C con vibración para obtener células individuales, en donde la relación en volumen de Colagenasa I y una proteasa neutra con respecto a los bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio es de 2:1.
40
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la Colagenasa I se usa a una concentración del 0,1 % y la proteasa neutra se usa a una concentración del 0,2 %.
45
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los bloques de tejido de la mucosa olfativa de los cornetes superior y medio se lavan antes de la digestión para eliminar la sangre residual de la superficie.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la sangre residual en la superficie se elimina mediante una solución de penicilina y solución salina fisiológica en una relación de 1:1.
50
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la mucosa olfativa limpia se corta en bloques de tejido con un tamaño de 1 mm³ en una placa de cultivo con unas tijeras esterilizadas.
55
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la densidad de inoculación del cultivo en la etapa (1) es de 1×10⁴ células/ml.
13. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-11, en donde la densidad de inoculación del cultivo en la etapa (2) es de 1×10⁴ células/ml.
60
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el método de preparación comprende además una etapa de pases o crioconservación de las células envoltentes olfativas.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el método de preparación comprende además una etapa de crioconservación de las células envoltentes olfativas.
65

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la criopreservación es criopreservación a una temperatura ultrabaja.
- 5 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la criopreservación de las células envoltoras olfatorias a una temperatura ultrabaja comprende las siguientes etapas: filtrar el sobrenadante de cultivo cuando las células en la etapa (2) crecen de forma adherente al 90 % para preparar un medio de criopreservación para la criopreservación de las células envoltoras olfatorias.
- 10 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el medio de criopreservación para las células envoltoras olfatorias consiste en el suero autógeno, el sobrenadante de cultivo, DMEM/F12 y DMSO.
- 15 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el medio de criopreservación para las células envoltoras olfatorias consiste en el suero autógeno, el sobrenadante de cultivo, DMEM/F12 y DMSO en una relación en volumen de 5:2:2:1.
20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el método de preparación comprende además una etapa de cultivo de diferenciación de las células envoltoras olfatorias.
- 20 21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la etapa de cultivo de diferenciación de las células envoltoras olfatorias comprende añadir un medio de cultivo para la diferenciación de células gliales a las células envoltoras olfatorias y cultivar para la diferenciación.
- 25 22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el medio de cultivo para la diferenciación de células gliales consiste en un medio de cultivo para células envoltoras olfatorias y el suero autógeno en una relación en volumen de 87:13.

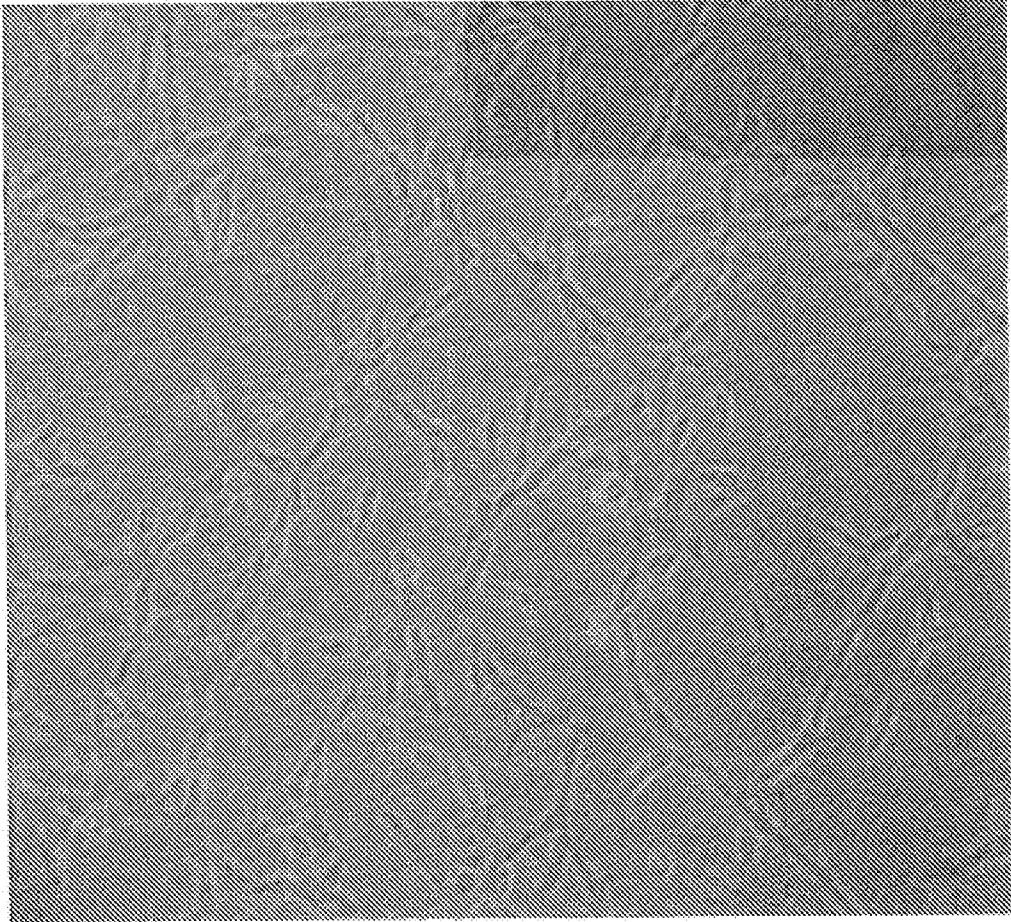


Figura 1

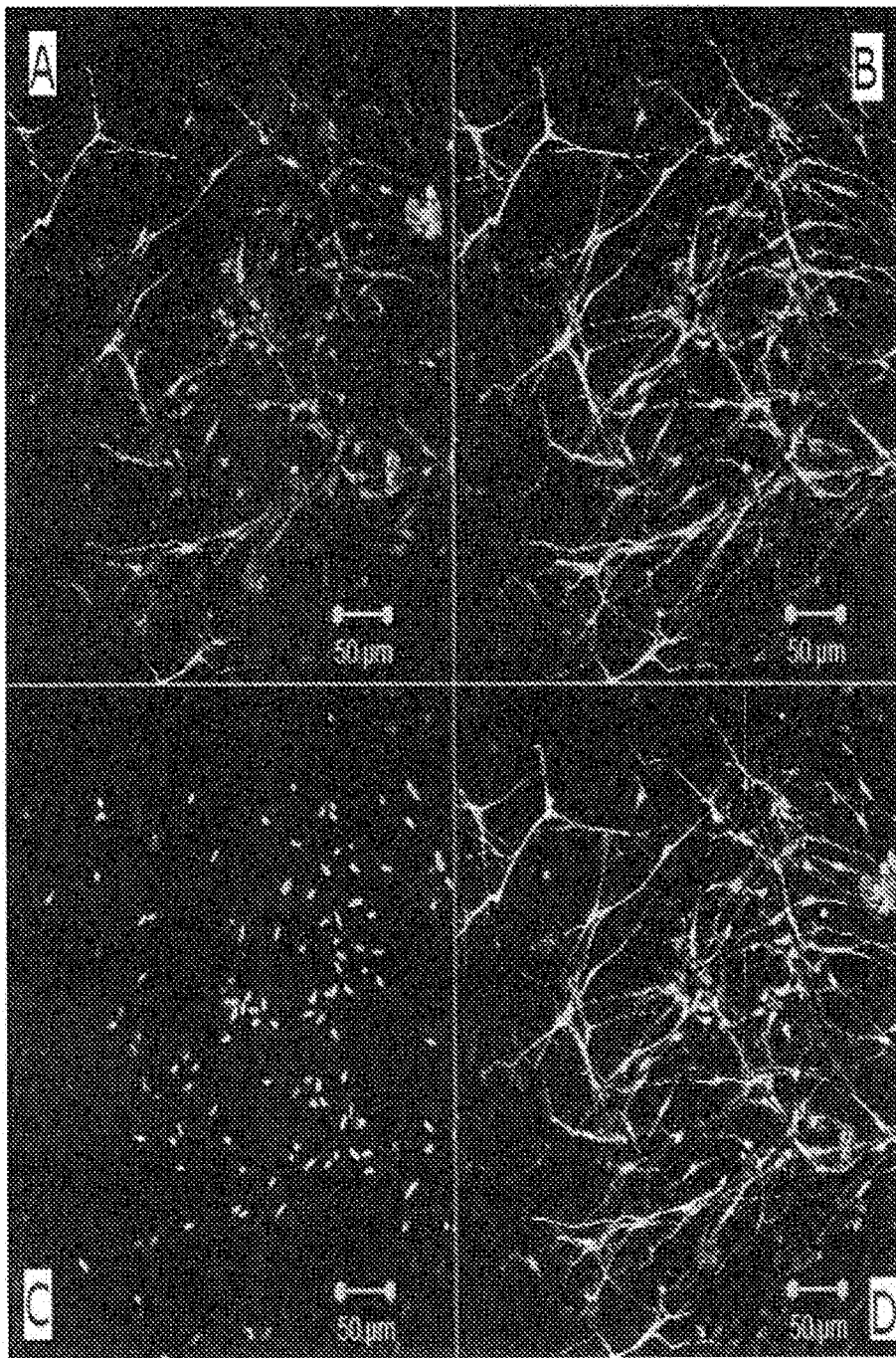


Figura 2