



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 190 336**

② Número de solicitud: 200100909

⑤ Int. Cl.7: **C12N 5/10**

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **19.04.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

Fecha de la concesión: **07.12.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2005**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2005**

⑰ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Rubio Rodríguez, María Paz;  
Ramón Cueto, Almudena y  
Blasco Marhuenda, María Antonia**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Glía envolvente olfatoria modificada genéticamente mediante introducción de telomerasa.**

㉒ Resumen:

Glía envolvente olfatoria modificada genéticamente mediante introducción de telomerasa.

La presente invención consiste en la utilización de la glía envolvente olfatoria modificada mediante introducción de telomerasa o de cualquier molécula o moléculas que ésta produce, bien sea sola o en combinación con otras estrategias reparadoras, para tratar lesiones del sistema nervioso de mamíferos, incluidos los primates.

ES 2 190 336 B1

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

## DESCRIPCION

Glía envolvente olfatoria modificada genéticamente mediante introducción de telomerasa.

**Antecedentes**

Los sistemas nervioso periférico (SNP) y central (SNC) de mamífero adulto no responden de la misma manera frente a las lesiones. Mientras que los axones dañados en el SNP son capaces de regenerar y reconectarse con las estructuras a las que inervaban antes de la lesión (Ramón y Cajal, S. (1914) Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Imprenta hijos de Nicolás Moya, Madrid; Fawcett, J. W., and Keynes, R. J. (1990) Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 43-60), los axones que sufren una agresión dentro del SNC son incapaces de crecer, quedando interrumpida permanentemente la vía nerviosa lesionada (Ramón y Cajal, S. (1914) Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Imprenta hijos de Nicolás Moya, Madrid; Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P., and Bandtlow, C. E. (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 565-595; Silver, J. (1994). Inhibitory molecules in development and regeneration. *J. Neurol.* 242: 22-44). La diferente capacidad regenerativa de los SNP y SNC se debe a la existencia de un entorno celular distinto en ambos. En el SNP los axones están rodeados por las células de Schwann, que producen las moléculas necesarias para que los axones puedan crecer (Fawcett, J. W., and Keynes, R. J. (1990) Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 43-60). En el SNC, sin embargo, las células de glía (oligodendroglía, astrogliá y microglía) constituyen un obstáculo para la regeneración de los axones, pues crean un entorno no permisivo para su extensión (Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P., and Bandtlow, C. E. (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 565-595; Silver, J. (1994). Inhibitory molecules in development and regeneration. *J. Neurol.* 242: 22-44; Bovolenta, P., Wandosell, F., and Nieto-Sampedro, M. (1992). CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog. Brain Res.* 94, 367-379; Giulian, D. (1993) Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia* 7: 102-110; Fitch, M. G., and Silver, J. (1997). Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp. Neurol.* 148, 587-603; Miranda, J. D., White, L. A., Marcillo, A. E., Wilson, C. A., Jagrid, J., and Whittemore, S. R. (1999) Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 156: 218-222). De esta regla general se aparta el bulbo olfatorio, una estructura del SNC donde la regeneración axonal es posible a lo largo de toda la vida del individuo (Graziadei, P., and Monti Graziadei, G. (1980) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. *J. Neurocytol.* 9: 145-162; Doucette, J. R., Kiernan, J. A., and Flumerfelt, B. A. (1983) The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory

axons in the central or peripheral nervous system. *J. Anat.* 137: 1-19). En esta región del SNC, los axones de las neuronas olfatorias seccionados se regeneran y restablecen la integridad histológica y funcional del sistema. Una diferencia notable entre el bulbo olfatorio y el resto del SNC radica en la presencia un tipo especial de célula glial en el bulbo olfatorio denominado glía envolvente olfatoria (OEG, de las siglas en inglés: "olfactory ensheathing glia") (Golgi, C. (1875) Sulla fina anatomía del bulbi olfactorii. *Ti Revista Sperimentale di Freniatria* 1: 403-425; Blanes, T. (1898) Sobre algunos puntos dudosos de la estructura del bulbo olfatorio. *Rev. Trim. Micrograf.* 3: 99-127; Barber, P. C., and Lindsay, R. M. (1982) Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience* 7: 3077-3090; Doucette, J.R. (1984) The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat. Rec.* 210: 385-391). La OEG rodea a los axones olfatorios en todo su recorrido, aislándolos así del entorno no permisivo propio del SNC. Según parece, estas células aportan a los axones las moléculas que requieren para su crecimiento (revisado en Ramón-Cueto, A., and Valverde, F. (1995) Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* 14: 163-173; Ramón-Cueto, A., and Avila, J. (1998) Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res. Bull.* 46: 175-187).

La ausencia de regeneración axonal en el SNC ocasiona una pérdida permanente de las funciones mediadas por las neuronas lesionadas. En el caso de la médula espinal, no se puede transmitir al cerebro la información sensitiva recogida por el SNP (ascendente), ni se pueden transmitir las órdenes motoras generadas por el cerebro a las estructuras efectoras (información descendente), apareciendo una pérdida de la sensibilidad y una parálisis por debajo del nivel de la lesión. La gran prevalencia de las lesiones medulares en la práctica clínica, así como sus consecuencias devastadoras para los pacientes que las sufren han instado la búsqueda de una estrategia experimental que permita a los axones lesionados crecer dentro del SNC. La mayoría de estas estrategias se han empleado en lesiones medulares incompletas y responden a una misma idea básica: proporcionar al axón lesionado el entorno adecuado que necesita para su elongación (revisado en Olson, L. (1997) Regeneration in the adult central nervous system: Experimental repair strategies. *Nat. Med.* 3: 1329-1335; Bregman, B. S. (1998) Regeneration in the spinal cord. *Curr. Op. Neurobiol.* 8: 800-807; Fawcett, J. W. (1998) Spinal cord repair: from experimental models to human application. *Spinal Cord* 36: 811-817). Con este fin, se han colocado en el lugar de la lesión injertos de nervio periférico (Ramón y Cajal, S. (1914) Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Imprenta hijos de Nicolás Moya, Madrid; David, S., and Aguayo, A. J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system bridges after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214, 931-933; Cheng, H., Cao, Y., and Olson, L. (1996). Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function.

Science 273, 510-513), de tejido nervioso embrionario (Bregman, B. S., Broude, E., McAtee, M., and Kelley, M. S. (1998). Transplants and neurotrophic factors prevent atrophy of mature CNS neurons after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 149, 13-27), infusiones de factores neurotróficos y/o moléculas de adhesión (Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y-A., and Schwab, M.E. (1994). Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367, 170-173; Xu, X. M., Guénard, V., Kleitman, N., Aebischer, P., and Bunge, M. A. (1995). Combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp. Neurol.* 134, 261-272; Grill, R., Murai, K., Blesch, A., Gage, F.H., and Tuszynski, M.H. (1997). Cellular delivery of Neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17, 5560-5572; Menei, P., Montero-Menei, C., Whittemore, S. R., Bunge, R. P., and Bunge, M. B. (1998). Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 10, 607-621), trasplantes de células de Schwann (Xu, X. M., Guénard, V., Kleitman, N., Aebischer, P., and Bunge, M. A. (1995). Combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp. Neurol.* 134, 261-272; Menei, P., Montero-Menei, C., Whittemore, S. R., Bunge, R. P., and Bunge, M. B. (1998). Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 10, 607-621; Guest, J. D., Rao, A., Olson, L., Bunge, M. B., and Bunge, R. P. (1997). The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 148, 502-522), trasplantes de células modificadas genéticamente para producir moléculas favorecedoras de la regeneración axonal (Tuszynski, M. H., Peterson, D. A., Ray, J., Baird, A., Nakahara, Y., and Gage, F. (1994). Fibroblast genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord. *Exp. Neurol.* 126, 1-14), etc. En todos estos estudios, axones medulares lesionados crecieron dentro de los múltiples entornos permisivos implantados, pero fueron incapaces de salir de ellos y no pudieron regenerar en el entorno inhibidor del SNC. Este hecho impidió que se pudiera restablecer la integridad histológica perdida y, por lo tanto, la función del sistema dañado. Más prometedores han sido los estudios en los que empleando macrófagos (Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G. J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., and Schwartz, M. (1998). Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.* 4, 814-821) y puentes de nervio periférico con fibrina en lesiones completas (Cheng, H., Cao, Y., and Olson, L. (1996). Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 273,

510-513) y anticuerpos bloqueantes de la actividad inhibidora de la mielina en lesiones parciales (Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P., and Bandtlow, C. E. (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 565-595; Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H. N., Gao, D., and Schwab, M. E. (1995). Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378, 498-501; Dyer, J. K., Bourque, J. A., and Steeves, J. D. (1998). Regeneration of brainstem-spinal axons after lesion and immunological disruption of myelin in adult rat. *Exp. Neurol.* 154, 12-22; Thallmair, M., Metz, G. A. S., Graggen, W. J. Z., Raineteau, O., Kartje, G. L., and Schwab, M. E. (1998). Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat. Neurosci.* 1, 124-131) se consiguió que algunos axones regeneraran distancias cortas y una recuperación parcial de la función motora.

En estudios previos se han utilizado con éxito trasplantes de OEG para promover la regeneración en la médula espinal de axones de las raíces dorsales (Ramón-Cueto, A., and Nieto-Sampedro, M. (1994). Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp. Neurol.* 127, 232-244; Navarro, X., Valero, A., Gudio, G., Flores, J., Rodríguez, F. J., Verdú, E., Pascual, R., Cuadras, J., and Nieto-Sampedro, M. (1999). Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann. Neurol.* 45, 207-215) y de axones corticoespinales, lesionados de forma selectiva (Li, Y., Field, P. M., and Raisman, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277, 2000-2002). Sin embargo, dado que las lesiones medulares en pacientes son más complejas y normalmente afectan a varios tipos de haces o incluso a todos, nosotros en los últimos años hemos adoptado como modelo la sección medular completa en ratas adultas. Cualquier estrategia capaz de reparar lesiones tan severas sería seguramente eficaz en lesiones más leves. Recientemente hemos demostrado que trasplantes de OEG pueden reparar funcional y estructuralmente médulas espinales completamente seccionadas de ratas adultas (Ramón-Cueto, A., Plant, G. W., Avila, J., and Bunge, M. B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J. Neurosci.* 18, 3803-3815; Ramón-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., and Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25, 425-435). En un primer trabajo (Ramón-Cueto, A., Plant, G. W., Avila, J., and Bunge, M. B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J. Neurosci.* 18, 3803-3815), la OEG se utilizó para potenciar la capacidad regeneradora de implantes de células de Schwann en médulas espinales completamente seccionadas. En estos animales, axones seroto-

ninérgicos descendentes y propioespinales ascendentes crecieron distancias largas (1,5 cm y 2,5 cm respectivamente) en los muñones medulares. En nuestro último trabajo (Ramón-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., and Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25, 425-435) se evaluó el potencial reparador que la glía envolvente tiene *per se* y sin estrategias adicionales. Para ello se trasplantó OEG pura en ratas cuyas médulas habían sido completamente seccionadas y se analizó el grado de recuperación motora en los animales trasplantados durante los ocho meses que siguieron a la cirugía. Mediante el trasplante de OEG hemos conseguido que ratas parapléjicas recuperasen el movimiento voluntario de sus patas traseras, la sensibilidad al tacto leve y propioceptiva y que axones motores (corticoespinales, serotoninérgicos y noradrenérgicos) regeneraran largas distancias (3 cm) en las médulas espinales de estos animales.

Nuestros resultados constituyen la mayor recuperación histológica y funcional descrita hasta la fecha en mamíferos adultos con lesión medular completa. Por ello, estos resultados y los trasplantes de OEG, arrojan nueva luz sobre el problema de la regeneración nerviosa y abren nuevas perspectivas para el tratamiento de las parálisis y de aquellas patologías del sistema nervioso que requieran de crecimiento axonal para su curación, en otros mamíferos incluido el hombre.

#### Descripción de la invención

La ausencia de regeneración axonal en el sistema nervioso central (SNC) lesionado produce pérdidas funcionales permanentes e irreversible. Mediante el trasplante de glía envolvente olfatoria (OEG) hemos conseguido reparar lesiones del SNC de mamíferos adultos obteniendo la mayor recuperación funcional e histológica descrita hasta la fecha. Los trasplantes de OEG constituyen una terapia nueva y nuestros resultados previos utilizando estas células han abierto nuevas perspectivas para el tratamiento de aquellas patologías del sistema nervioso que requieran de crecimiento axonal para su curación en mamíferos, incluido el hombre.

La necesidad de obtener de una forma rápida y eficaz un gran número de células para su trasplante en la terapia de las lesiones del sistema nervioso nos han llevado a extender la vida media de la OEG. Hemos elegido la extensión de la vida media mediante introducción de telomerasa porque las células así modificadas son estables, no se transforman y no se hacen tumorales con el tiempo ni forman tumores tras ser trasplantadas (*Nature Genetics* 21, 111-114; 1999). Debido a esto, las células modificadas mediante esta técnica son óptimas para ser usadas en terapia celular en humanos. Mediante la extensión de la vida media de la OEG con telomerasa se pretende que, en un futuro, se pueda disponer de un banco de OEG almacenada en los hospitales, para que sea utilizada como terapia en las lesiones del sistema nervioso, simplificándose, además, el procedimiento de obtención de OEG y garantizando su disponibilidad en el momento en que sea necesario. Además, se podrían utilizar estas células en la caracterización

bioquímica y molecular de la glía envolvente y en la purificación de moléculas relevantes producidas por la OEG. Estas moléculas podrían constituir en un futuro dianas farmacológicas en el tratamiento de las lesiones del sistema nervioso.

Son objeto de la patente que solicitamos:

1. La OEG de mamífero modificada genéticamente mediante introducción de telomerasa.
2. La utilización de la OEG modificada mediante telomerasa o de cualquier molécula o moléculas que ésta produce, bien sea sola o en combinación con otras estrategias reparadoras, para tratar lesiones del sistema nervioso de mamíferos, incluidos los primates.
3. Cualquier otro uso terapéutico o experimental de la OEG modificada mediante telomerasa.

A la vista de estos antecedentes hemos extendido la vida media de la OEG por las siguientes razones:

- A) Se pretende poder obtener, de una forma rápida y eficaz, un gran número de células para su trasplante en la terapia de las lesiones del sistema nervioso a nivel experimental primero y clínico después.
- B) La caracterización bioquímica y molecular de la OEG y la purificación de moléculas relevantes, requieren un gran número de células. La mayor vida de la OEG permitirá disponer de la cantidad de células necesaria para llevar a cabo dichos estudios. De estos estudios podrían derivar nuevas moléculas y dianas farmacológicas para el tratamiento de las lesiones del sistema nervioso de mamíferos.
- C) Se pretende que, en un futuro, se pueda disponer de un banco de OEG almacenada en los hospitales, para que sea utilizada como terapia en las lesiones de la médula espinal, en aquellos casos en los que el autotrasplante no sea posible o esté contraindicado. Además, con la OEG de vida media más larga se simplificaría enormemente el procedimiento de obtención de OEG y se garantizaría su disponibilidad en el momento en que fuera necesario.

Actualmente existe una gran polémica acerca de la utilización, con fines terapéuticos, de células que han sido inmortalizadas con oncogenes, aunque éstos estén controlados por represores. Esta controversia deriva del riesgo que existe de que el oncogén que tienen incorporado las células, escape a la represión y se desarrollen tumores en los pacientes trasplantados. Dado que en un futuro se pretende el uso terapéutico de la OEG para tratar lesiones del sistema nervioso de humanos, hemos utilizado una técnica no oncogénica para extender su vida media. Las ventajas de extender la vida media de la OEG mediante introducción de telomerasa son las siguientes:

- A) No se introduce ningún oncogén en las células, con lo que no existe riesgo de desarrollo de tumores.
- B) Hay estudios muy recientes que demuestran que células humanas así inmortalizadas son estables, no se transforman y no se hacen tumorales con el tiempo ni forman tumores tras ser trasplantadas (Nature Genetics 21, 111-114; 1999). Debido a esto, las células modificadas mediante esta técnica son óptimas para ser usadas en terapia celular en humanos.
- C) No es necesario un tratamiento con otras drogas para controlar la expresión o represión del gen, con lo que se eliminan los efectos secundarios derivados del tratamiento prolongado con las drogas represoras.
- D) Las células, después de varias divisiones y de forma espontánea, se hacen senescentes y dejan de dividirse por acortamiento de los telómeros, como cualquier otra célula normal del organismo.

En definitiva, la OEG modificada genéticamente para expresar telomerasa sí podrá utilizarse en un futuro con fines terapéuticos en humanos, ya que no plantea los problemas de las otras técnicas de inmortalización celular.

- *Extensión de la vida media de la OEG mediante introducción de telomerasa.* -

Se utilizan las células empaquetadoras antrópicas Phoenix, las cuales, mediante el Método convencional de fosfato cálcico, son transfectadas para introducir el gen que codifica el componente proteico de la riboproteína telomerasa. Para ello se utiliza el plásmido pBabe-*mtert*, que contiene dicho gen en lugar de las secuencias "env, pol y gag" del retrovirus. Este plásmido contiene además el gen de resistencia a puromicina. Para aumentar la expresión desde la LTR y la estabilidad viral, al día siguiente se añade medio con dexametasona y butirato sódico. A las 48 horas post-transfección se recogen los sobrenadantes y se titulan para calcular la producción de vector retroviral de estas células, mediante ensayo de formación de clones resistentes a puromicina.

Los cultivos puros de OEG se obtienen de los bulbos olfatorios de ratas adultas, como se ha descrito en estudios previos (Ramón-Cueto, A., Plant, G. W., Avila, J., and Bunge, M. B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J. Neurosci.* 18, 3803-3815; Ramón-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., and Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25, 425-435; Ramón-Cueto, A. and Nieto-Sampedro, M. (1992). Glial cells from the adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47, 213-220; Ramón-Cueto, A., Pérez,

J., and Nieto-Sampedro, M. (1993). *In vitro* en-folding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1172-1180). Para infectar la OEG, y transferir así el gen de interés, estas células son incubadas con los sobrenadantes obtenidos de las células Phoenix transfectadas, y que contienen el retrovirus defectivo, en presencia de polibreno y de mitógenos que estimulan la división de la OEG. La multiplicidad de infección (*mdi*) se mantiene cercana o por encima de 5. Estas infecciones se repiten en varias rondas sucesivas.

Para seleccionar las células del bulbo olfatorio resistentes, que han sido infectadas por el retrovirus, se incuban las células con puromicina, a la dosis que garantice que todas las células no transfectadas mueren en 4-6 días. Al cabo de este tiempo, las células que sobreviven son las que han sido infectadas y, por tanto, expresan también el gen *m-tert*.

Como control de transfección e infección, y para determinar su eficiencia, se realiza en paralelo la misma técnica descrita, con un plásmido similar a pBabe-*mtert*, el pBabe-*lacZ*, que contiene el gen de la  $\beta$ -galactosidasa en lugar de *m-tert*. Las células a las que se les ha introducido *lacZ* dan una coloración azul al ser reveladas con X-gal, pudiendo así ser visualizadas y cuantificadas.

En la figura 1 (A) las puntas de flecha rojas marcan células teñidas de azul, que han sido infectadas con los sobrenadantes obtenidos de las células Phoenix tras transfección con pBabe-*lacZ*. Las células infectadas conservan la morfología típica de la OEG. En la figura 1 (B) se muestra, a mayor aumento, una de estas células expresando  $\beta$ -galactosidasa (flecha roja).

Dados los resultados previos, la glía envolvente olfatoria (OEG) modificada con telomerasa se puede utilizar para reparar las lesiones del sistema nervioso de mamíferos incluidos los primates. Se podrán usar estas células y/o sus moléculas derivadas solas o en combinación con otras estrategias reparadoras. Además de utilizarse en lesiones de la médula espinal, se puede extender su uso a todas aquellas patologías del sistema nervioso que requieran de crecimiento axonal para su curación. Por ejemplo, se podrían utilizar en lesiones traumáticas o isquémicas de otras regiones del sistema nervioso (nervio óptico, etc.). Además, se podrán utilizar en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como por Ejemplo la enfermedad de Parkinson, Huntington, algunas degeneraciones retinianas, alguna ataxia, etc. Se podrán combinar con trasplantes neurales (neuroblastos, stem cells, neuronas modificadas genéticamente, etc ... ), para estimular el crecimiento axonal en las neuronas trasplantadas o de las del huésped.

La OEG modificada genéticamente mediante la introducción de telomerasa servirá también para hacer estudios de biología celular, molecular y estudios bioquímicos tanto *in vitro* como *in vivo*.

### REIVINDICACIONES

1. La OEG modificada genéticamente para expresar telomerasa, y **caracterizadas** por presentar una vida media más larga que la OEG original y propiedades similares a la misma.

2. Las moléculas producidas por la OEG según la reivindicación 1, **caracterizadas** por presentar actividad biológica para promover la reparación del sistema nervioso.

3. Un compuesto **caracterizado** por contener moléculas producidas por la OEG según la reivindicación 2.

4. Un compuesto según la reivindicación 3

**caracterizado** por contener una cantidad terapéuticamente eficaz de una o varias moléculas producidas por la OEG según la reivindicación 2.

5. Empleo de la OEG en la elaboración de un medicamento para el tratamiento, en mamíferos, de enfermedades y lesiones del sistema nervioso de tipo traumático, isquémico, degenerativo, tumoral y de otra índole.

6. Empleo de las moléculas producidas por la OEG en la elaboración de un medicamento para el tratamiento, en mamíferos, de enfermedades y lesiones del sistema nervioso de tipo traumático, isquémico, degenerativo, tumoral y de otra índole.

5

10

15

20

25

30

35

40

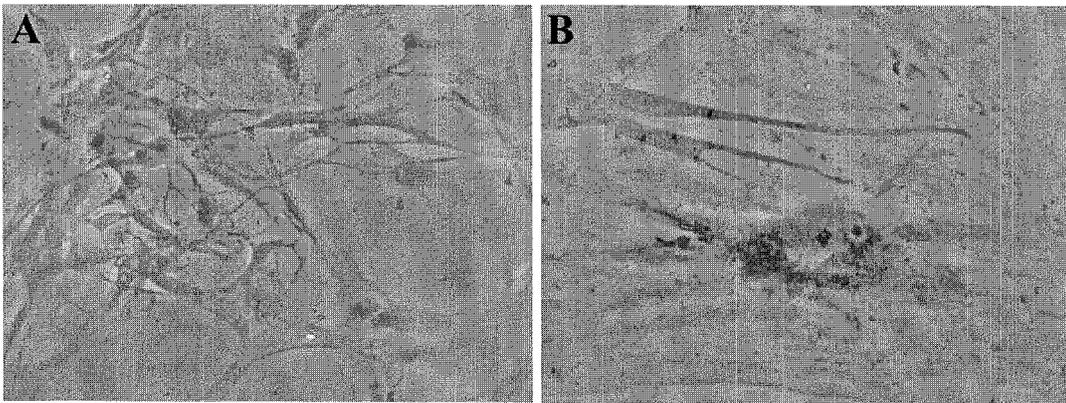
45

50

55

60

65



**Figura 1**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 190 336

② Nº de solicitud: 200100909

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 5/10

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RAMÓN-CUETO, A. et al.: "Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia", Neuron, (febrero 2000), Vol. 25 (2), páginas 425-435, ISSN: 0190-5295, todo el documento.	1-6
A	WO 9106631 A1 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 16.05.1991, todo el documento.	1-6

#### 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

23.06.2003

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1