

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 145 694**

② Número de solicitud: 009800313

⑤ Int. Cl.⁷: A61K 35/12

C12N 5/06

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **11.02.1998**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2000**

Fecha de concesión: **19.12.2000**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2001**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.02.2001

⑰ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE SEVILLA**
c/ San Fernando, 4
41004 Sevilla, ES

⑱ Inventor/es:
Armengol Butrón de Mugica, José Angel;
Fernández Espejo, Emilio;
Montoro Laseca, Rafael Jesús y
López Barneo, José

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Método de aislamiento de un agregado celular y agregado celular resultante.**

㉑ Resumen:

Método de aislamiento de un agregado celular y agregado celular resultante.

La invención se refiere al uso de células o agregados de células sensibles a hipoxia, por ejemplo del cuerpo carotídeo, sometidos o no a un tratamiento enzimático suave, que no llegue a disgregar el tejido en células aisladas. De este modo, el tejido se trata enzimáticamente pero no se dispersa mecánicamente. Las células segregan neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas y podrían ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas originadas por el déficit de una molécula, que sería el producto de secreción de las células trasplantadas. Es de destacar que las células segregan en respuesta a la hipoxia y, en un cerebro huésped, las células trasplantadas se van a encontrar en una situación de baja presión parcial de oxígeno, estimulante de la secreción.

ES 2 145 694 B1

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Método de aislamiento de un agregado celular y agregado celular resultante.

Título

Método de aislamiento de un agregado celular y agregado celular resultante.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas por utilización de células o agregados de células sensibles a hipoxia, por ejemplo del cuerpo carotídeo, sometidos o no a un tratamiento enzimático suave, que no llegue a disgregar el tejido en células aisladas. De este modo, el tejido se trata enzimáticamente pero no se dispersa mecánicamente. En el procedimiento, las células segregan neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas y podrían ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas originadas por el déficit de una molécula, que sería el producto de secreción de las células trasplantadas.

Esta secreción podría revertir algunos de los déficit de la enfermedad, y conseguir una recuperación mucho mejor de la lograda hasta ahora por medio de la administración farmacológica de estas moléculas o de sus precursores. Asimismo en las enfermedades cerebrovasculares, en las cuales se ha originado pérdida de parte del parénquima cerebral, el implante celular podría ayudar a la mejora sustancial de las neuronas que permanezcan, y en ocasiones a reemplazar algunos de los circuitos sinápticos perdidos.

Estado de la técnica

El uso de células neurales o paraneurales que segregan neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas se ha empleado para el tratamiento de enfermedades degenerativas, siendo una terapia alternativa a la farmacológica. Ha sido utilizada a nivel experimental, aunque con éxito limitado hasta ahora en los ensayos clínicos. A fines de los años setenta y principios de los ochenta se observó el efecto beneficioso de transplantes intraestriatales de médula adrenal, que posee células cromafines secretoras de dopamina, en modelos de Parkinson experimental en ratas (Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. *Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of the nigrostriatal dopamine system.* Science 204:643-647, 1979.; Freed WJ, Morihisa JM, Spoor E, Hoffer BJ, Olson L, Seiger A, Wyatt R. *Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour.* Nature 292: 351-352, 1981). En los años ochenta se investigó el efecto terapéutico de los autotransplantes paraneurales de médula adrenal en enfermos de Parkinson. Estos transplantes han demostrado poca funcionalidad y un rechazo temprano (Backlund EO, Granbeg PO, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L. *Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism.* J. Neurosurg. 62:169-173, 1985. ; Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. *Open microsurgical autografts of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease.* N. Engl. J.

Med. 316: 831-834, 1987. ; Lindvall O, Backlund EO, Farde L, Sedvall G, Freeman R, Hoffer B, Nobin A, Seiger A, Olson L. *Transplantation in Parkinson's disease: tow case of adrenal medullary grafts to the putamen.* Ann. Neurol. 22: 457-468, 1987. ; Peterson DI, Price ML, Small CS. *Autopsy findings in a patient that had an adrenaltobrain transplant for Parkinson's disease.* Neurology 39: 144, 1988.). A principios de los años ochenta, se observó el efecto beneficioso de transplantes de células neurales obtenidas de sustancia negra fetal, utilizando el modelo de Parkinson experimental en roedores (Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH. *Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease.* Nature 298: 652-654, 1982.; Brundin P, Strecker RE, Lindvall O, Isacson O, Nilsson OG, Bardin G, Prochiantz A, Forni C, Nieoullon A, Widner H, Gage FH, Björklund A. *Intracerebral grafting of dopamine neurons.* Ann. NY Acad. Sci. 495: 473-496, 1987.). La funcionalidad y supervivencia de estos transplantes es mejor que la de los de transplantes de células cromafines adrenales, pero su uso muy limitado en ciertos países debido a criterios éticos o legales (Freed CR, Breese RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, Lone T, Zhang YB, Snyder JA, Wells TH. *Survival of implanted fetal dopamine cells and neurological improvement 12 and 46 months after transplantation for Parkinson's disease.* N Engl J Med 327: 1549-1555, 1992; Kordower JH, Freeman TB, Snow MD, Vingerhoets FJG, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP, Olanow C. *Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease.* N. Engl. J. Med, 332-1118-1124, 1995.). Por ello, se está ensayando a nivel clínico el uso de xenotransplantes con células fetales de sustancia negra no humana, de cerdo por ejemplo, con resultados esperanzadores.

Además, actualmente se ensaya el uso de otras células secretoras como transplantes en la enfermedad de Parkinson:

- a) Células secretoras de dopamina derivadas de neuroblastoma humano (líneas SK-N-SH, CHP126, BN69 y LAN5).
- b) Células multipotenciales modificadas genéticamente para producir tirosina hidroxilasa o dopamina (líneas HiB5, C17-2, CSM14.1). Aunque estas células han demostrado una funcionalidad limitada, esta línea de investigación basada en uso de células multipotenciales es de gran interés.
- c) Cotransplantes de células neurales fetales no humanas y células que segreguen factores de crecimiento (NGF, BDNF, GDNF). Los factores de crecimiento, especialmente el BDNF, mejoran sustancialmente la funcionalidad de células dopaminérgicas trasplantadas.
- d) Cotransplantes de células neurales fetales no humanas y células de Sertoli, que disminuyen la respuesta inmunitaria del tejido receptor. Todos estos estudios se encuentran

en fase experimental preclínica (Bottenstein JE. Differentiated properties of neural cell lines. En: *Funtinonally differntiated cell lines*, Sato GH (ed), Liss Press, Nueva York, pp. 155 - 184, 198 1.; Gage FH, Woiff JA, Rosenberg MB, Xu L, Yee JK, Shults C, Filedmann T. Grafting genetically modified cells to the brain: possibilities for the future. *Neuroscience* 23: 795-807, 1987.; Yurek DM, Sladek J R. Dopamine cell replacement: Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 415-440, 1990.; Yoshimoto Y, Lin Q, Collier TJ, Frim DM, Breakefield XO, Bohn MC, Astrocytes retrovirally transduced wit BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 691: 25-36, 1995.; Sanberg PR, Borlongan CV, Saporta S, Cameron DF. Testis-derived sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain, *Nature Biotechnol.* 14: 1692-1695, 1996; Martínez-Serrano A, Björklund A. Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci.* 20: 530-538, 1997).

En la enfermedad de Alzheimer, otra enfermedad degenerativa, los modelos utilizados han sido, en primer lugar, la lesión de los núcleos basales de Meynert, y a continuación realizar implantes de la zona de los ganglios basales procedente de embriones en el neocórtex de los animales. Estos implantes, aunque inicialmente (en las primeras 4 semanas) emiten prolongaciones, éstas no se mantienen más de 10 semanas (Dunnett, SB, Whishaw, IQ, Bunch ST y Fine A. 1986. *Brain Res.*, 378:357-371). La supervivencia de estos trasplantes mejora algo con la aplicación de ciclosporina A en las dos semanas posteriores al trasplante (Howard, MA, Dacey, RO y Winn HR- 1988. *J. Neurosurg.*, 69:121-126). Se ha comparado histológicamente la evolución de estos implantes en otras zonas como el ventrículo lateral, o el espacio subaracnoideo, no existiendo grandes diferencias (Kyoshima, K, Matsuda, M y Handa, J. 1992. *Nippon Geka Hokan.*, 61:19-26.). Estos últimos en el espacio subaracnoideo, consiguen alguna mejora aún cuando el implante no llega a proyectar sobre el córtex, por lo que se estima que factores que difundan desde el trasplante son los responsables de esta mejoría (Kyoshima, K, Matsuda, M y Handa, J. 1993. *Nippon Geka Hok@* 62:195-202.).

Otro modelo experimental para la enfermedad de Alzheimer, ha sido la lesión del neocórtex (por ejemplo con ácido kaínico), lo que provoca la degeneración de las células colinérgicas de los ganglios y núcleos basales que proyectan sobre esa zona de neocórtex. Si tras la lesión se implanta una suspensión celular de tejido cortical embrionario, se previene la degeneración de los ganglios y núcleos basales, que ahora proyectan sobre las células trasplantadas (Sofroniew, N, Isacson, O y Björklund, A. 1986. *Brain Res.*, 378: 409-415.). Dado que uno de los principales problemas es la duración del trasplante, se han ensayado microesferas biodegradables, que liberan factor de crecimiento nervioso hasta 5 semanas después de

trasplantadas, lo cual puede ayudar al mantenimiento del trasplante (Camarata, PJ, Suryanarayanan, R, Tumer, DA Parker RG y Ebner, TJ. 1992. *Neurosurgery*, 30:313-319.). Esta liberación también se ha conseguido desde células del animal modificadas genéticamente para secretar factor de crecimiento nervioso, lo que previene la degeneración de las células colinérgicas (Tuszynski, MH, Roberts, J, Senut, MC y Gage, FH. 1996. *Gene Ther.*, 3:305-314.).

En la enfermedad degenerativa de Huntington, también se ha utilizado un modelo animal consistente en la lesión del estriado, lo que origina una hiperactividad del animal y graves déficits en el aprendizaje. El implante en el estriado lesionado de una suspensión celular de neuronas de estriado de embriones, originan una mejora de la sintomatología del animal y una recuperación de la actividad enzimática de las neuronas afectadas por la lesión (Isacson, O, Brundin, P, Gage, FH y Björklund, A. 1985. *Neuroscience*, 16:799-817, Isacson, O, Dunnett, SB y Björklund, A. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:2728-2732.). El estudio de estos implantes con microscopía óptica y electrónica, revelan una organización similar al caudado normal, aunque con menor número de sinapsis dentro del trasplante (DiFiglia M, Schiff L y Deckel, AW. 1988. *J. Neurosci.*, 8:1112-1130.). Estos implantes también previenen en parte la lesión que origina la inyección de ácido kaínico o quinolínico en el estriado (Tulipan, N, Luo, SQ, Alien, GS y Whetsell, WO. 1988. *Exp. Neurol.*, 102:325-332.). Este efecto preventivo también se obtiene con la aplicación de MK801 (Giordano, M, Ford, LM, Shipley, MT y Sanberg, PR. 1990. *Brain Res. Bull.*, 25:453-465.) o fibroblastos secretores de factor de crecimiento nervioso (Schumacher, JM, Short, W, Hyman, BT, Breakfield, XO y Isacson, O. 1991. *Neuroscience*, 45:561-570; Frim, DM, Short, MT, Rosenberg, WS, Simpson, J, Breakefield, XO y Isacson, O. 1993, *J. Neurosurg.*, 78:267-271), antes de realizar la lesión.

Se han realizado implantes en primates de neuronas del estriado de fetos de rata, acompañando inmunosupresión del huésped, pero la supervivencia del trasplante no es muy grande (Isacson, O, Riche, D, Hantraye, P, Sofroniew, MV y Maziere, M. 1989. *Exp. Brain Res.*, 75:213-220.). En los modelos con primates, la resonancia magnética nuclear ha demostrado ser un método útil para localizar tanto el área de lesión, como el implante posterior (Simmons, NE, Helm, GA, Cail, WS, Bennett JP y Jane, JA. 1994. *Exp. Neurol.*, 125:52-57.). También se han realizado trasplantes de neuronas del estriado de fetos de humano en ratas, obteniéndose una buena supervivencia del trasplante (Pundt, LL, Kondoh, T, Conrad, JA y Low, WC. 1996. *Brain Res. Bull.*, 39:23-32.; Grasbond-Frodl, EM, Nakao, N, Lindvall, O y Brundin, P. 1996. *Neuroscience*, 73:171-181). La recuperación de la sintomatología se correlaciona con el número de neuronas del implante que sean capaces de expresar marcadores típicos de las neuronas del estriado como la fosfo proteína DARPP-32 (Nakao, N, Grasbond-Frodl, EM, Widner, H y Brundin, P. 1996. *Neuroscience*, 74:959-970.), siendo mejores los implantes pro-

cedentes de embriones más jóvenes (Fricker, RA, Torres, EM y Dunnett, SB. 1997. Neuroscience, 79:695-710).

Descripción general de la invención

La invención se refiere al empleo de células o agregados de células sensibles a hipoxia, que expresen y segreguen neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas. El uso de agregados se refiere al no tratamiento o al tratamiento enzimático suave del tejido donante sin dispersión mecánica, con el fin de que las células sensibles a hipoxia del tejido se implanten poco dañadas y rodeadas de cierta cantidad de tejido de sostén. Los trasplantes con células o agregados celulares pueden ser de utilidad clínica para la terapia de enfermedades neurodegenerativas o cerebrovasculares.

En estas enfermedades, el déficit de algunas moléculas (p.ej. neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.), podría ser compensado por la secreción de las células implantadas que, al conservar sus relaciones intercelulares, pueden sobrevivir mucho más tiempo (hasta 4 meses en nuestros ensayos), a la vez que el tratamiento enzimático rompe las estructuras conjuntivas, que aíslan a las células en el tejido original, facilitando la salida de las sustancias secretadas así como su nueva conexión con las neuronas del tejido que se intenta reparar. El hecho de utilizar células que secreten sustancias en respuesta a la hipoxia, es novedoso y tiene la ventaja de aprovechar la baja presión parcial de oxígeno, en la que se van a encontrar estas células trasplantadas en el cerebro huésped, como estímulo para la formación de neurotransmisores y su posterior secreción.

Descripción detallada

A continuación se presenta un experimento basado en el empleo de agregados celulares de cuerpo carotídeo para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson experimental en roedores. Ha de entenderse que este experimento no es limitante, pues puede aplicarse a seres humanos y a otros cuadros degenerativos o cerebrovasculares.

Para la experimentación se empleó el modelo de Parkinson en ratas, basado en la lesión unilateral de la sustancia negra mediante un tóxico, la 6-hidroxidopamina, que destruye selectivamente las neuronas dopaminérgicas. Las ratas con una lesión superior al 90% de la sustancia negra presentan una sintomatología que se asemeja al Parkinson en humanos: acinesia, rigidez, lateralización en los movimientos (rotación en la rata) y déficit sensoriomotor. Estos defectos funcionales pueden ser evaluados con una batería de tests adecuada. Además, la lateralización en los movimientos puede exacerbarse mediante la inyección de amfetamina (5 mg/kg), lo que induce intensa "rotación ipsilateral" (hacia el lado de la lesión), cuya frecuencia si es superior a 360 giros por hora es indicativa de una lesión superior al 90%.

Para cada rata parkinsoniana, un trozo de cuerpo carotídeo de rata se implantó en el estriado denervado (coordenadas AP=0.2, L=-3, V=-5.5 respecto a bregma), a los diez días de la lesión unilateral de la sustancia negra mediante 1 \square de 6-OHDA (4 \square g/ \square l; coordenadas AP=-5.3, L=-2.3, V=-8.2). El trozo de cuerpo carotídeo (1/4 a 1/5 del glomus; 400 a 600 células glómicas) había

sido tratado enzimáticamente de un modo suave sin dispersión mecánica final del tejido, mediante incubación durante 20 min en solución Tyrode sin calcio ni magnesio, con collagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml) y ADNasa (0.5 mg/ml). A los diez, treinta y noventa días tras el trasplante, se evaluó la funcionalidad y eficacia del injerto desde un punto de vista neuroquímico, morfológico y conductual. El estudio neuroquímico se basó en el registro amperométrico, en rodajas de tejido cerebral, de los niveles de dopamina intraestriales en rodajas de tejido. Los estudios morfológicos fueron de carácter inmunocitoquímico, mediante el empleo de tinciones y anticuerpos de tirosina hidroxilasa, que indican la presencia o no de células productoras de dopamina. La evaluación conductual se realizó mediante una batería de tests apropiada, que permitió valorar las respuestas motoras y sensoriomotoras del animal.

Los resultados funcionales fueron excelentes: los registros amperométricos, que detectaron una caída superior al 90% de dopamina en el estriado denervado sin trasplante, revelaron una recuperación hasta del 65% de los niveles de dopamina en el estriado con trasplante de tres meses de evolución (figura 1). Los estudios morfológicos mostraron la presencia de trasplantes con células glómicas positivas a la tirosina hidroxilasa, asociadas en glomérulos y que, a los tres meses, presentaban largas fibras que salían del trasplante hacia el estriado, que daban a las células un aspecto neuronal (figura 2). Las fibras presentaban abundantes varicosidades de un modo regular a lo largo de su recorrido, que sugieren el establecimiento de sinapsis dopaminérgicas en *passant*, del mismo modo que hacen los axones procedentes de la sustancia negra en el estriado normal. Todo lo anterior se correlacionó con una muy buena recuperación conductual: a) la rotación, tanto espontánea como inducida por amfetamina, desapareció durante el primer mes, b) los reflejos sensoriomotores se recuperaron al cabo de tres meses (figura 3).

Descripción de las figuras

Figura 1. Medidas amperométricas de la señal de dopamina en animales lesionados y en animales trasplantados. En A se muestran dos registros realizados en el mismo animal en el estriado normal (N) y en el denervado (D). En B se compara la media de 6 medidas en estriados normales (rectángulo blanco), con la media de 7 medidas realizadas en estriados denervados (rectángulo negro). En C se muestran dos registros efectuados en otro animal en su estriado normal (N) y en su estriado reinervado (R), tres meses después del trasplante. D. Comparación de la media de 5 medidas realizadas en un estriado normal (rectángulo blanco), y 5 medidas realizadas en un estriado reinervado (rectángulo negro). En A y C, las líneas con una K, indican el tiempo de aplicación de una solución con 66 mM CLK. En B y D, las barras indican la desviación estándar y SD en el eje de ordenadas significa secreción de dopamina medida en picoamperios.

Para la amperometría, los animales se decapitaron bajo anestesia y el cerebro se cortó coronalmente en solución Krebs-Ringer fría, en rodajas de 150-200 \square m. Para las medidas am-

perométricas, las rodajas se colocaron en una cámara de registro perfundida con una solución de (valores en mM): 150 ClNa, 2.7 ClK, 2.5 Cl₂Ca, 1 Cl₂Mg y 10 Hepes (pH=7.4). Para inducir la liberación de dopamina se reemplazó con otra solución semejante pero con 66 mM ClK y 84 mM ClNa. La dopamina se registró mediante un electrodo de fibra de carbono de 12 μ m de diámetro, conectado a un convertidor corriente-voltaje y polarizado a un voltaje constante de +650 mV. Las señales amperométricas se filtraron a 50-100 Hz y se grabaron.

Figura 2. Características morfológicas de transplantes de cuerpo carotídeo a los tres meses de implantación. Los cortes coronales a través del estriado muestran la forma (A, B) y la organización (C, D) de los transplantes. Se observan células glómicas aisladas y en glomérulos (cabeza de flecha), con evidente morfología neuronal, presentando largas dendritas (flechas). Calibración: A, 1 mm; B, 500 μ m, C-D, 15 μ m.

Para la inmunocitoquímica se perfundieron las ratas con 150 ml de solución salina con tampón fosfato (PBS), seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M (pH 7.2-7.4). Tras la extracción, el cerebro se fijó en paraformaldehído en tampón fosfato (PBS) 0.1 M (pH 7.2-7.4), y se sumergió en sacarosa al 30% con PB hasta que se humedeció. Se hicieron cortes coronales de 30 μ m con un microtomo de congelación y se incubaron en PBS/0.2% gelatina/0.1% Tritón X-100 (PBS-G-T) con suero normal de cabra (vector), durante 1 h para bloquear los sitios específicos de unión. Luego, las secciones se incubaron durante toda la noche con anticuerpos policlonales anti-TH (1:30000) en PBS-G-T. Tras el lavado de PBS-T, las secciones se incubaron en anticuerpo biotinilado de conejo (1:200). Luego, las secciones se incubaron con un kit ABC (1:100 Vector) durante 1 h, y los sitios de fijación del anticuerpo se revelaron mediante 3,3'-diaminobencidina. Tras el lavado en PBS, las secciones se montaron en portaobjetos gelati-

nizados, se deshidrataron y se cubrieron.

Figura 3. Evolución temporal de la rotación y la orientación sensoriomotora en ratas control (círculos abiertos), ratas parkinsonianas con transplante de cuerpo carotídeo (cuadrados llenos) y ratas parkinsonianas con falso transplante (triángulos abiertos). La rotación se evaluó mediante la rotación espontánea neta en el test del campo abierto (A), y la rotación inducida por anfetamina (B). La orientación sensoriomotora se evaluó a través del test de "whisker-touch" (C), y la locomoción tigmotática neta en el campo abierto (D). Medias \pm EEM, *p < 0.05, **p < 0.01 respecto a ratas con falso transplante; #p < 0.05, ##p < 0.01 respecto a ratas parkinsonianas con transplante de cuerpo carotídeo o falso. Abreviaturas de la figura: RE: rotación espontánea; RA: rotación inducida por anfetamina; WT: "whisker-touch" test; LT: locomoción tigmotática; rtn: rotación neta; rt: número de rotaciones en 60 min; lat: latencia (s); tn: tigmotaxia neta; cl: contralateral; il: ipsilateral; t: transplante; e.t.: evolución temporal; Pre: siete días antes de la lesión; Les: siete días tras la lesión de sustancia negra; 10d, 1m y 3m: diez días, 1 mes y 3 meses tras el transplante. La flecha indica el momento del transplante (diez días tras la lesión de la sustancia negra).

La rotación neta en el campo abierto (1 x 1 m) se define como el porcentaje de giros de 360° hacia el lado de la lesión o ipsilaterales menos los contralaterales (test de 10 min). La anfetamina se inyectó a 5 mg/kg IP, e induce rotaciones ipsilaterales, que se cuantifican desde 30 a 90 min tras la inyección. El test de "whisker-touch" consistió en acercar un palito por la derecha del animal hasta mover las vibrasas, y medir la latencia de respuesta de acercamiento al palito (máximo 25 s). La locomoción tigmotática neta se midió en el campo abierto, definiéndose como el porcentaje de tiempo que el animal pasa recorriendo el enclave pegado a las paredes (tiempo ipsi menos contralateral).

REIVINDICACIONES

1. Un método de aislamiento de un agregado celular **caracterizado** porque el método incluye la sección de un tejido que tiene células sensibles a hipoxia, que liberan uno o más neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas, obteniéndose secciones del tejido sin llegar a realizar una dispersión celular.

2. Un método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en él se trata el tejido seccionado con una solución enzimática, para facilitar la difusión de neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas.

3. Un método según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la solución enzimática contiene enzimas proteolíticas.

4. Un método según la reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el tratamiento enzimático es con colagenasa y tripsina, siendo la concentración y el tiempo de acción insuficientes para separar las células del agregado.

5. Un método según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la solución además contiene ADNasa.

6. Un método según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el tratamiento enzimático se realiza en una solución Tyrode, sin calcio ni magnesio, que contiene colagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml) y ADNasa (0.5 mg/ml).

7. Un método según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el agregado es lavado para eliminar las enzimas de la solución enzimática.

8. Un método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el agregado es centrifugado y resuspendido para eliminar las enzimas, en un medio aceptable fisiológicamente.

9. Un agregado de células **caracterizado** por obtenerse por el método según reivindicaciones 1 a 8.

10. Un agregado de células, según reivindicación 9, **caracterizado** porque integra una sección de tejido paraneural de un donante animal o humano.

11. Un agregado de células, según reivindicaciones 9 a 10, **caracterizado** porque integra una sección de cuerpo carotídeo.

12. Un agregado de células, según reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado** porque integra secciones de 0.1 a 0.5 mm, en su dimensión más pequeña.

13. Un agregado de células, según reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado** porque integra secciones de 0.1 a 0.5 mm de diámetro.

14. Un agregado de células, según reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado** porque tiene un diámetro de 0.2 a 0.3 mm.

15. Un agregado de células, según las reivindicaciones 9 a 14, **caracterizado** porque integra de 50 a 10.000 células.

16. Un agregado de células, según las reivindicaciones 9 a 15, **caracterizado** porque las estructuras conjuntivas que separan las células en el tejido donante han sido rotas.

17. Un agregado de células, según la reivindicación 16, **caracterizado** porque las estructuras han sido enzimáticamente digeridas y/o degradadas.

18. Un agregado de células, según reivindicaciones 16 y 17, **caracterizado** porque las estructuras han sido enzimáticamente digeridas y/o degradadas usando una o más proteasas.

19. Un agregado de células, según la reivindicación 18, **caracterizado** porque las estructuras conjuntivas han sido degradadas mediante tratamiento, con colagenasa y tripsina.

20. Un agregado de células, según las reivindicaciones 9 a 19, **caracterizado** porque el tejido ha sido tratado también con ADNasa.

21. Un agregado de células, según reivindicaciones 9 a 20, **caracterizado** porque es una sección de un cuerpo carotídeo.

22. Un agregado de células, según las reivindicaciones 9 a 21, **caracterizado** porque ha sido limpiado para quitar el tejido adiposo y conectivo circundante.

23. Un compuesto **caracterizado** porque integra un agregado de células según se ha reivindicado en las reivindicaciones 9 a 22, junto a un excipiente aceptable farmacológicamente.

24. Un compuesto según la reivindicación 23, **caracterizado** porque integra una suspensión de 1 a 500 agregados, según las reivindicaciones 9 a 22, en un medio aceptable fisiológicamente.

Figure 1B

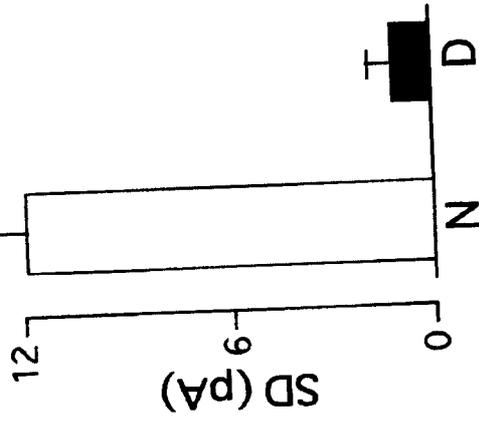


Figure 1D

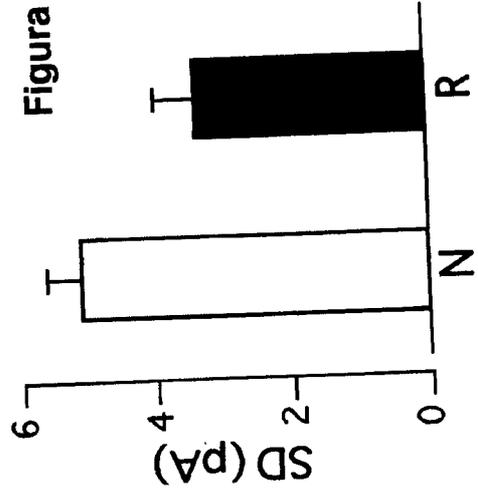


Figure 1A

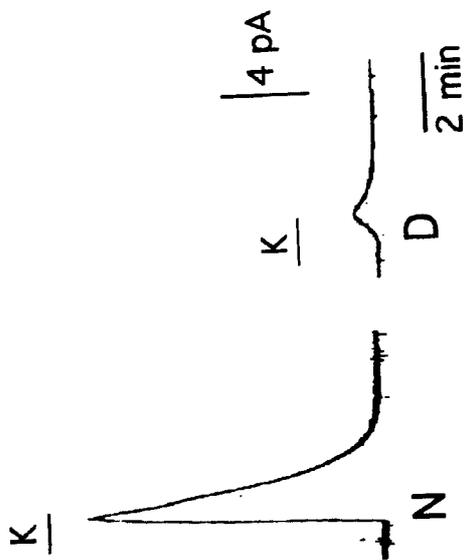


Figure 1C

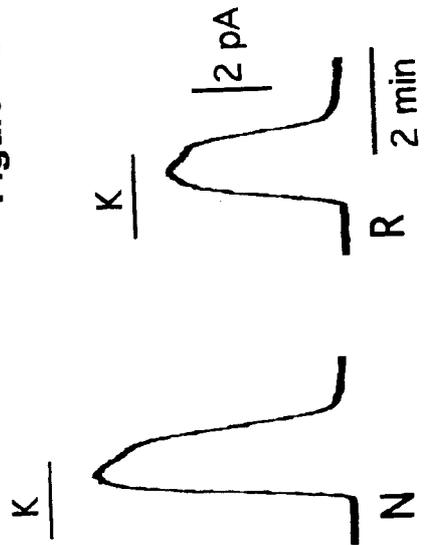


Figura 2A

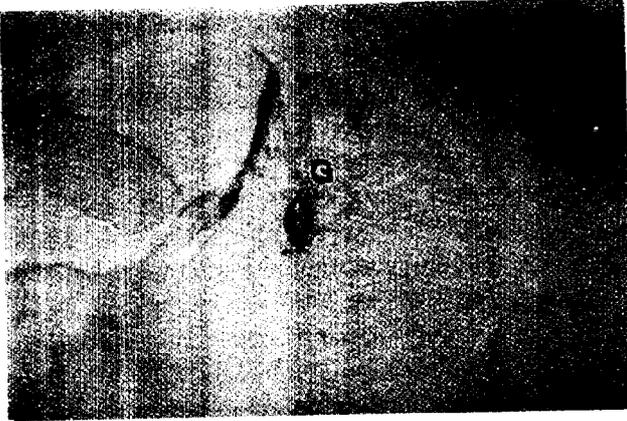


Figura 2B

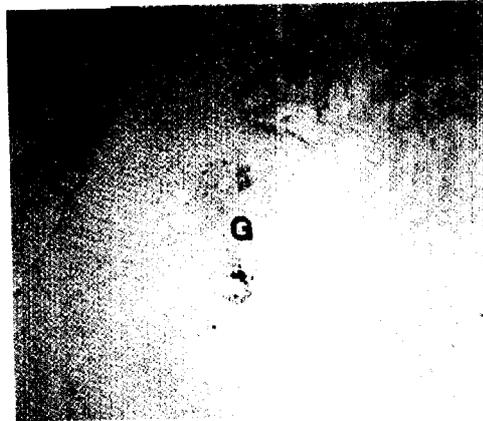


Figura 2C



Figura 2D



Figura 3B

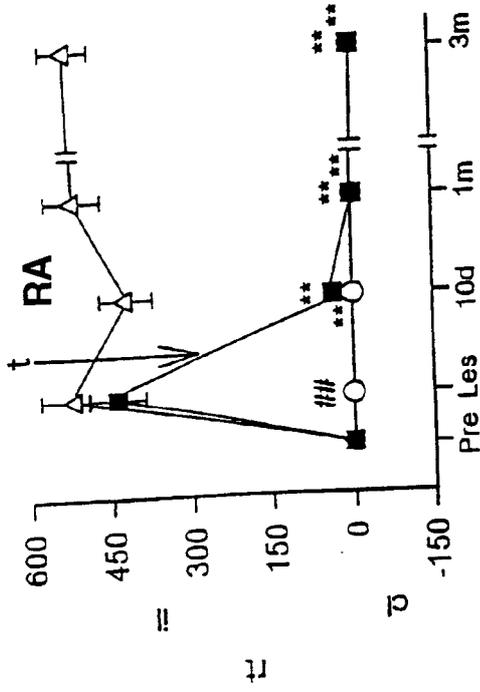


Figura 3D

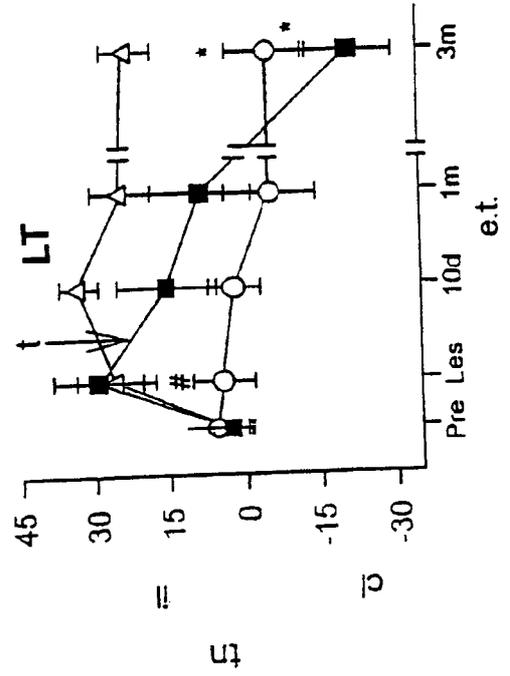


Figura 3A

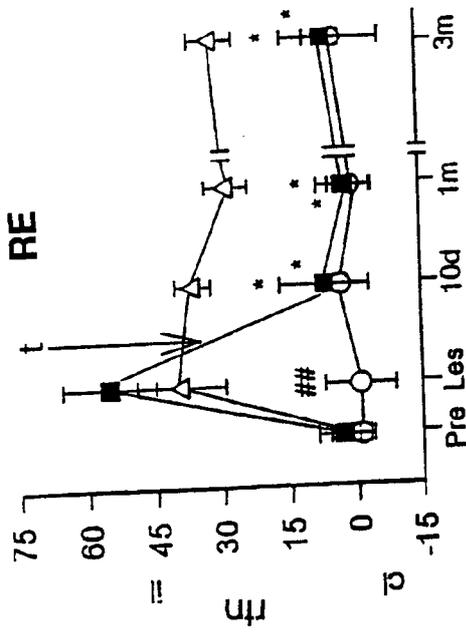
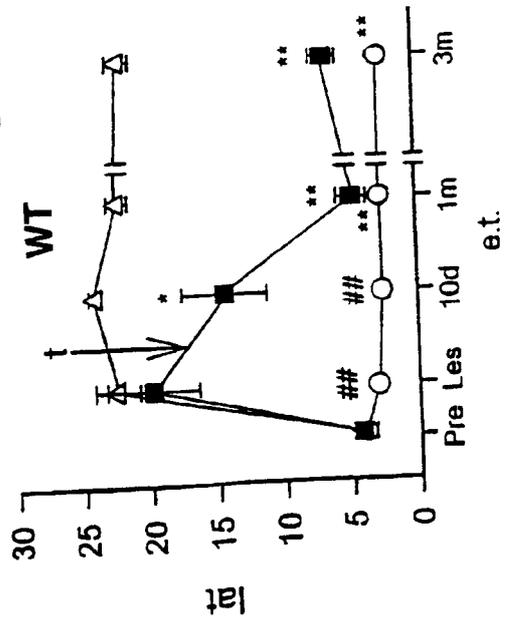


Figura 3C





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 35/12, C12N 5/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ESPEJO, E.F. et al.: "Cellular and functional recovery of parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates", febrero 1998, Neuron, Vol. 20 (2), páginas 197-206, todo el documento.	1-11, 15-24
A	GUOYING, B. et al.: "Comparison of adrenal medullary, carotid body and PC12 cell grafts in 6-OHDA lesioned rats", 1988, Brain Res. Bull., Vol. 20, páginas 399-406, todo el documento.	1-24
A	MOKRY, J.: "Parkinson's disease: contemporary state and perspectives", 1994, Sbornik Vedeckych Prací LF UK Hradec Králové, Vol 37 (1), páginas 5-12, todo el documento.	1-24
A	HANSEN, J.T. et al.: "Paraneural grafts in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: morphological aspects of adrenal chromaffin and carotid body glomus cell implants", 1988, Progress in Brain Res., Vol. 78, páginas 507-511, todo el documento.	1-24

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 n.º:

Fecha de realización del informe

25.05.2000

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1