



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 108**

21 Número de solicitud: 200702167

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0797** (2010.01)

**A61K 35/30** (2006.01)

**C12R 1/91** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **02.08.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2009**

Fecha de la concesión: **23.06.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **08.07.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**08.07.2010**

73 Titular/es: **Universidad de Sevilla**  
**Pabellón de Brasil**  
**Paseo de las Delicias, s/n**  
**41012 Sevilla, ES**

72 Inventor/es: **López Barneo, José;**  
**Pardal, Ricardo;**  
**Ortega-Sáenz, Patricia y**  
**Durán, Rocío**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

54 Título: **Células madre derivadas del cuerpo carotídeo y usos de las mismas.**

57 Resumen:

Células madre derivadas del cuerpo carotídeo y usos de las mismas caracterizadas porque son positivas para el marcador fenotípico GFAP (proteína ácida fibrilar de origen glial) y negativas para los marcadores fenotípicos TH (tirosina hidroxilasa) y nestina. Estas células madre pueden proliferar, autorenovarse y diferenciarse a células progenitoras y diferenciadas. Dichas células madre, progenitoras y diferenciadas pueden ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

ES 2 326 108 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Células madre derivadas del cuerpo carotídeo y usos de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el aislamiento y caracterización de células madre derivadas del cuerpo carotídeo (CC), a métodos para su expansión y diferenciación, y a sus potenciales aplicaciones tanto en investigación como en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

**Antecedentes de la invención**

El uso de células neurales o paraneurales que segregan neurotransmisores, neuromoduladores o enzimas, se ha empleado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, siendo una terapia alternativa a la farmacológica. Estas células se han utilizado a nivel experimental, aunque con éxito limitado hasta ahora, en ensayos clínicos.

A finales de los años setenta y principios de los ochenta se observó el efecto beneficioso de trasplantes intraestriatales de médula adrenal, que posee células cromafines secretoras de dopamina, en modelos de Parkinson experimental en ratas.

En los años ochenta se investigó el efecto terapéutico de los autotrasplantes paraneurales de médula adrenal en enfermos de Parkinson. Estos trasplantes han demostrado poca funcionalidad y un rechazo temprano. A principios de los años ochenta se observó el efecto beneficioso de trasplantes de células neurales obtenidas de sustancia negra fetal, utilizando el modelo de Parkinson experimental en roedores. La funcionalidad y supervivencia de estos trasplantes es mejor que la de los de trasplantes de células cromafines adrenales, pero su uso clínico está muy limitado a ciertos países debido a criterios éticos o legales. Además, los resultados obtenidos en ensayos realizados a doble ciego en pacientes, son menos favorables que lo esperado y en algunos casos el implante de células fetales produce complicaciones motoras indeseables. Se está ensayando a nivel clínico el uso de xenotrasplantes con células fetales de sustancia negra no humana, como por ejemplo del cerdo. Esta tecnología presenta, no obstante, limitaciones muy importantes tales como el fuerte rechazo inmunológico y la posible transferencia de agentes infecciosos patógenos entre especies.

A finales de los noventa se pusieron a punto agregados de células glómicas de cuerpo carotídeo para el tratamiento del Parkinson en modelos de la enfermedad en roedores (Espejo *et al.*, 1998; *Neuron* 20, 197-206). Posteriormente se confirmó que la técnica era factible en un modelo superior de primates (Luquin *et al.*, 1999; *Neuron* 22, 743-750). Finalmente se llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos con pacientes de Parkinson (Arjona *et al.*, 2003; *Neurosurgery* 53, 321-328), donde la mejoría fue siempre parcial debido probable y principalmente al poco tejido glómico del que se partía.

La terapia celular, basada en el principio de la capacidad regenerativa de células dopaminérgicas a partir de la aplicación de células madre, constituye una vía terapéutica prometedora en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Uno de los objetivos principales que persigue la investigación en este campo consiste en identificar el tipo óptimo de célula madre que pueda ser aplicado con seguridad y eficacia en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El tipo de célula madre idóneo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas debería ser capaz de expandirse suficientemente, presentar capacidad de diferenciación a células específicas (e.g., células dopaminérgicas) plenamente funcional, integrarse en el tejido nervioso estableciendo eventualmente, aunque no necesariamente, contacto electroquímico con las células adyacentes, y, por último, no estar limitada su aplicación por cuestiones de rechazo inmunológico ni por consideraciones éticas.

En este sentido, la solicitud de patente norteamericana US 2003/0095956 describe el empleo de una población de células neurales no diferenciadas que comprende células con un fenotipo GFAP-/nestina+, procedentes de cerebro y estriado de embriones de ratón y de tejido cerebral de ratón juvenil y adulto potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, e.g., Parkinson. No obstante, estas células son diferentes de las células nestina+ proporcionadas por la presente invención, ya que estas últimas proceden del cuerpo carotídeo (y no del cerebro o del estriado) y presentan la propiedad de diferenciarse a células glómicas (TH+ y sensibles a hipoxia e hipoglucemia), propiedad que no tienen los precursores nestina+ aislados del cerebro o del estriado. Asimismo, la solicitud de patente internacional WO 00/29549 describe un método para cultivar células madre de la cresta neural (NCSC) que comprende cultivar dichas NCSC bajo condiciones de hipoxia; dichas NCSC son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la deficiencia en un neurotransmisor, e.g., la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer. Las células proporcionadas por esta invención son células diferentes a las definidas en dicha solicitud de patente WO 00/29549; además, en esta invención se usa la hipoxia para estimular la proliferación de las células del CC porque se sabe desde hace mucho tiempo que la hipoxia estimula el crecimiento del CC *in vivo*.

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas mediante terapia celular, todavía no se ha encontrado una población de células madre adultas que pueda ser usada con seguridad y eficacia en el tratamiento de dichas enfermedades neurodegenerativas. Dicha población celular proporcio-

naría un método simple y eficaz de reparar los daños causados por las enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de mejorar la eficacia de las terapias existentes, así como la búsqueda de alternativas que puedan restaurar el daño causado por las enfermedades neurodegenerativas.

- 5 Adicionalmente, sigue existiendo la necesidad de aislar, cultivar, mantener, propagar y diferenciar células madre adultas para desarrollar tipos celulares destinados a distintas aplicaciones. Dichas aplicaciones pueden incluir el uso de células madre autólogas para tratar enfermedades, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas, cardíacas, etc.

### Compendio de la invención

10

Ahora, los inventores han descubierto, sorprendentemente, la presencia de células madre en el sistema nervioso periférico (SNP) adulto, más concretamente, en el cuerpo carotídeo (CC). Dichas células madre adultas, al contrario de lo que se podía pensar inicialmente, no son las células glómicas (o tipo I), sino las células sustentaculares o tipo II. Tal como se muestra en los ejemplos de esta descripción, dichas células madre adultas tienen la capacidad de dividirse (proliferación), renovarse a sí mismas a través de la división celular durante largos periodos de tiempo (auto-renovación) y, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, la capacidad de ser inducidas a diferenciarse en otros tipos de células diferenciadas específicas (diferenciación). Además, los inventores han desarrollado un método *in vitro* para la expansión del CC que permite obtener agregados celulares capaces de expresar y segregar factores tróficos, neurotransmisores, neuromoduladores, enzimas, etc. Los trasplantes con dichas células madre adultas o agregados celulares obtenidos por dicho método de expansión podrían ser de utilidad en clínica, en particular, en la terapia de enfermedades neurodegenerativas.

Como se ha mencionado previamente en los Antecedentes de la Invención, los auto-trasplantes con células procedentes del cuerpo carotídeo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas son conocidos, ya que se sabe que en estas patologías el déficit de algunas moléculas (por ejemplo, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.) puede ser compensado mediante la implantación de células capaces de expresar y secretar dichas moléculas. En cualquier caso, los auto-trasplantes con células glómicas procedentes del CC han resultado insuficientes para paliar los daños provocados por enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, por lo que es preciso mejorar dichos tratamientos o encontrar alternativas a los mismos. Los experimentos que más adelante se detallan muestran cómo las células glómicas, obtenidas por el método proporcionado por esta invención, unido al hecho de ser capaces de obtener una mayor cantidad de las mismas, permite mejorar las metodologías de tratamiento por auto-trasplante de células del CC que existen en la actualidad.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con una célula madre adulta aislada, procedente del CC, en adelante “célula madre de la invención”, caracterizada porque es positiva para el marcador fenotípico GFAP (proteína ácida fibrilar de origen glial) y negativa para los marcadores fenotípicos TH (tirosina hidroxilasa) y nestina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula progenitora adulta, aislada, derivada de dicha célula madre de la invención, en adelante “célula progenitora de la invención”, caracterizada porque es positiva para el marcador fenotípico nestina. En una realización particular dicha célula progenitora de la invención es tenue o débilmente positiva para el marcador fenotípico GFAP y positiva para el marcador fenotípico nestina. En otra realización particular, dicha célula progenitora de la invención es negativa para el marcador fenotípico GFAP y positiva para el marcador fenotípico nestina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula diferenciada, adulta, derivada de cualquiera de los tipos celulares anteriores (es decir, de la célula madre de la invención o de la célula progenitora de la invención), en adelante, “célula diferenciada de la invención”, caracterizada porque es negativa para el marcador fenotípico nestina y es positiva para un marcador de especialización; en una realización particular, dicho marcador de especialización es la tirosina hidroxilasa (TH) o la actina de músculo liso (SMA).

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula inmortalizada de forma reversible, en adelante “célula inmortalizada de la invención”, siendo dicha célula una célula madre de la invención, una célula progenitora de la invención o una célula diferenciada de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una población, aislada, de células derivadas de CC, en adelante “población celular de la invención”, que comprende un conjunto de células seleccionadas del grupo formado por las células madre de la invención, las células progenitoras de la invención, las células diferenciadas de la invención, las células inmortalizadas de la invención, y combinaciones de las mismas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la expansión de dichas células madre de la invención o de dichas células progenitoras de la invención, que comprende cultivar dichas células madre o progenitoras de la invención bajo condiciones de hipoxia en un medio de cultivo específico para la cresta neural.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, o combinaciones de las mismas, o de dichas células inmortalizadas de la invención, o de dicha población celular de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención o combinaciones de las mismas, o de dichas células inmortalizadas de la invención, o de dicha población celular de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en el tratamiento de lesiones isquémicas del sistema nervioso, en el tratamiento de lesiones traumáticas del sistema nervioso, o en el tratamiento de lesiones autoinmunes del sistema nervioso.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de tratamiento de una enfermedad, preferentemente una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad causada por una lesión isquémica, traumática o autoinmune del sistema nervioso que comprende injertar (implantar o transplantar) en las regiones afectadas por dicha enfermedad, una cantidad terapéuticamente efectiva de dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención o combinaciones de las mismas, o de dichas células inmortalizadas de la invención, o de dicha población celular de la invención, preferentemente células diferenciadas de la invención, en particular, células glómicas (nestina-/TH+), preferentemente en forma de neuroesferas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para evaluar *in vitro* la respuesta celular a un compuesto potencialmente terapéutico que comprende poner en contacto un cultivo que comprende células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención o combinaciones de las mismas, y/o células inmortalizadas de la invención, y/o una población celular de la invención con un compuesto potencialmente terapéutico y evaluar los efectos causados por dicho compuesto sobre las células presentes en dicho cultivo.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Neurogénesis inducida por hipoxia crónica en el cuerpo carotídeo adulto. Análisis por inmunocitoquímica de cuerpos carotídeos aislados de ratones tratados con BrdU y expuestos a hipoxia crónica (10% de O<sub>2</sub>). En el panel A se muestra el crecimiento típico de la masa de células neuronales glómicas TH+ en respuesta al estímulo hipóxico (21 días). En el panel B se muestra la incorporación de BrdU a las células proliferativas tras 7 días en hipoxia, y el consiguiente marcaje de la progenie diferenciada. La tinción de TH indica células glómicas, la tinción con BrdU indica células proliferativas, y la fluorescencia de DAPI muestra los núcleos. Panel C: Curso temporal de los cambios en el número de células y en el volumen del parénquima del cuerpo carotídeo (ordenada) en animales expuestos a hipoxia crónica (abscisa). Panel D: Reversibilidad del crecimiento del cuerpo carotídeo en animales devueltos a normoxia (21% O<sub>2</sub>) durante 1 mes. En el diagrama de barras se compara una cuantificación del número de células TH+ y células TH y BrdU dobles positivas en los cuerpos carotídeos renormóxicos, con los valores de normoxia e hipoxia (\*significativamente diferente a normoxia, p<0,01; #significativamente diferente a hipoxia, p<0,05). En los paneles E y F se muestran a distinto aumento un ejemplo de una sección de cuerpo carotídeo re-normóxico, para ilustrar que aproximadamente la mitad de las células glómicas han sido sustituidas por nuevas células. Escalas: 50 micras en los paneles A, B y E, y 10 micras en el panel F.

Figura 2: Procedencia de la cresta neural (CN) de las células glómicas TH+ preexistentes y recién formadas. Panel A: Estrategia de estudio de células derivadas de la cresta neural en el cuerpo carotídeo mediante el uso de un ratón transgénico Wnt1-cre/LacZ floxeado. En este modelo animal las células positivas para Wnt1, y todos sus derivados, expresan la galactosidasa, y por tanto muestran un precipitado azul tras la tinción con X-gal (puntas de flecha en el panel B). Panel C: Detección inmunohistoquímica de TH, BrdU, y de los núcleos (DAPI), en la misma sección mostrada en B. El panel D muestra la mezcla de ambas imágenes, ilustrando que las células glómicas tanto BrdU positivas como BrdU negativas derivan de la cresta neural. La célula BrdU+, TH- y LacZ+ señalada por la punta de flecha negra podría representar un progenitor amplificador transitorio. Escala: 10 micras.

Figura 3: Formación de neuroesferas y multipotencia de las células madre del cuerpo carotídeo *in vitro*. Panel A: Foto de campo claro de las neuroesferas resultantes tras un cultivo de 10 días. El detalle muestra un ejemplo de los típicos engrosamientos o glomérulos (puntas de flecha) que aparecen en las neuroesferas. El panel B muestra un análisis por inmunohistoquímica de una sección fina de neuroesfera (campo claro a la izquierda), ilustrando la presencia de progenitores nestina+ en el núcleo de la neuroesfera, y de células glómicas TH+ en el glomérulo (derecha). El panel C muestra una neuroesfera muy crecida (20 días en cultivo) con dos glomérulos grandes conteniendo multitud de células TH+ diferenciadas. El panel D muestra la diferenciación hacia célula muscular lisa (SMA+) de los progenitores de cuerpo carotídeo tras sembrar las neuroesferas a substrato adherente. En el panel E se muestra una imagen a mayor aumento del área encuadrada en D. Nótese la presencia de células glómicas TH+ en el centro de la colonia. Escalas: 100 micras en los paneles A y E, 50 micras en los paneles B y C, y 1 mm en el panel D.

Figura 4: Identificación de las células madre del cuerpo carotídeo. Panel A: Curso temporal de la formación *in vitro* de neuroesferas de cuerpo carotídeo de rata. La aparición de células glómicas (TH+) está precedida por la formación de un núcleo de la neuroesfera constituido por progenitores nestina+. El panel B muestra un análisis por citometría de flujo de las células del cuerpo carotídeo, utilizando como marcadores HNK-1 y p75. Sólo las células dobles negativas (ventana de selección #3) fueron capaces de crecer formando neuroesferas en cultivo. La separación de células HNK-1+ (ventana #1) y p75+ (ventana #2) dio siempre resultados negativos. El panel C muestra que las células HNK-1+ eran todas células glómicas TH+. En el panel D se puede observar la detección inmunohistoquímica del marcador glial GFAP, y del BrdU, dentro de cuerpos carotídeos de ratones normóxicos, hipóxicos, y re-normóxicos. La desaparición y subsiguiente aparición de la tinción con GFAP sugería que las células gliales tipo II, activadas por hipoxia, son las células progenitoras del cuerpo carotídeo. Escalas: 50 micras en los paneles A y D, y 10 micras en el panel C.

Figura 5: Las células gliales tipo II se diferencian hacia células neuronales tipo I en respuesta a hipoxia. Panel A: Estrategia para probar el linaje glial de los progenitores de cuerpo carotídeo capaces de diferenciarse hacia células glómicas. Se analizaron por inmunohistoquímica los cuerpos carotídeos de ratones transgénicos GFAP-cre/LacZ floxeado sometidos a hipoxia, para estudiar los derivados de células tipo II, que aparecerían como LacZ+. Panel B: Tinción con X-gal de una sección fina de cuerpo carotídeo transgénico e hipóxico, indicando la presencia de precipitado azul (puntas de flecha) en dos células diferentes. El panel C muestra la detección inmunohistoquímica de TH, BrdU y de los núcleos. La mezcla de ambas imágenes mostrada en el panel D ilustra cómo las dos células glómicas neoformadas en este glomérulo derivan de células tipo II GFAP+. Escala: 10 micras.

Figura 6: Las células glómicas generadas a partir de células madre *in vitro* muestran respuestas quimiorreceptoras y electrofisiológicas maduras. Panel A: Grupo de células glómicas (TH+) separadas de una neuroesfera, y diagrama de un electrodo de fibra de carbono utilizado para el registro de la secreción catecolaminérgica a partir de célula única. Panel B: Registros amperométricos típicos obtenidos a partir de grupos de células glómicas en cultivo en respuesta a estímulos fisiológicos como la hipoxia (cambio de la tensión parcial de O<sub>2</sub> de 145 mm de Hg a 15 mm de Hg) o la hipoglucemia (cambio de 5 mM glucosa a 0 glucosa). Cada espiga amperométrica representa un único evento excitotóxico. Panel C: Resumen cuantitativo de las tasas de secreción inducidas por el descenso en los niveles de O<sub>2</sub> y glucosa. El panel D muestra registros típicos de patch-clamp con corrientes voltaje-dependientes de entrada (calcio) y salida (potasio), registradas a partir de una célula glómica presente en un glomérulo de una neuroesfera. El panel E muestra la correspondiente curva corriente/voltaje para las corrientes de potasio, y el panel F muestra registros de patch-clamp con corrientes de calcio obtenidas tras bloquear los canales de potasio con cesio intracelular. Nótese que estas propiedades electrofisiológicas celulares, muy similares a las descritas en células glómicas maduras *in vivo*, son esenciales para la regulación de la exocitosis en estas células quimiorreceptoras. Escala en el panel A: 20 micras.

Figura 7: Las células glómicas neoformadas producen GDNF *in vivo*. Se analizaron por inmunohistoquímica los cuerpos carotídeos de ratones heterocigotos GDNF/LacZ expuestos a hipoxia crónica para observar la producción de GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales) en células glómicas neoformadas. El panel A muestra una imagen a poco aumento de una sección fina de uno de estos cuerpos carotídeos teñida con X-gal. Además del cuerpo carotídeo (CB), también se indican la posición del ganglio cervical superior (SCG) y de la arteria carótida interna (ICA). Nótese la concentración de los depósitos de X-gal en el cuerpo carotídeo. El panel B muestra una imagen a mayor aumento del área encuadrada en A, con dos claros precipitados azules (puntas de flecha) demostrando la expresión de la galactosidasa y por tanto la producción de GDNF. Panel C: Detección inmunohistoquímica de TH, BrdU y los núcleos, en la misma sección. La mezcla de imágenes mostrada en el panel D ilustra cómo los precipitados (puntas de flecha) corresponden a producción de GDNF en células glómicas neoformadas. Escalas: 50 micras en el panel A, y 10 micras en los paneles B, C y D.

Figura 8: Modelo de neurogénesis en el cuerpo carotídeo adulto. Arriba. Esquema de un glomérulo de cuerpo carotídeo con vasos sanguíneos y fibras nerviosas aferentes rodeándolo. Las células glómicas neuronales están envueltas por células tipo II gliales. También se muestra un progenitor amplificador transitorio activado por la hipoxia. Abajo. Secuencia hipotética de eventos celulares que ocurren en el cuerpo carotídeo durante un ciclo de hipoxia/renormoxia.

Figura 9: Formación de neuroesferas y multipotencia a partir de células madre GFAP+ del cuerpo carotídeo. (A) izquierda: Foto en campo claro de una neuroesfera proveniente de una célula GFAP+, X-gal+, dispersada a partir de cuerpos carotídeos de ratones GFAP-cre/LacZ floxeado. Derecha: Identificación inmunocitoquímica de células TH+ (puntas de flecha). Las imágenes aumentadas en (B) ilustran la colocalización de los depósitos de X-gal en células TH+ (puntas de flecha). (C) izquierda: Foto en campo claro de una neuroesfera proveniente de una célula GFAP+, X-gal+ cultivada en sustrato adherente. Derecha: Identificación inmunocitoquímica de células TH+ (puntas de flecha). Las imágenes aumentadas en (D) ilustran la colocalización de los depósitos de X-gal en células SMA+ de músculo liso. Escalas: 10 micras en el panel (A), 5 micras en los paneles (B) y (D), y 50 micras en el panel (C).

Figura 10: Análisis cuantitativo de los progenitores del cuerpo carotídeo durante una exposición a hipoxia/renormoxia *in vivo*. (A-C) Ejemplos representativos de células GFAP+, nestina+ (puntas de flecha), y GFAP tenue, nestina+, en cuerpos carotídeos de rata normóxica o expuesta a un ciclo de hipoxia (16 días)/renormoxia (18 días). Escalas: 5 micras en los paneles (A) y (C), y 10 micras en (B). (D) Gráfico cuantitativo ilustrando las modificaciones en la cantidad de los distintos tipos celulares del cuerpo carotídeo durante el experimento. Para los conteos de células GFAP+ y/o nestina+, los cuerpos carotídeos se dispersaron y las células se fijaron para inmunocitoquímica inmediatamente tras el sembrado en cultivo. Este procedimiento fue necesario debido a que las células tipo II GFAP+ son difíciles de identificar en las rodajas de tejido, y, además, la tinción con nestina también funciona mejor en células dispersas. Nótese la marcada disminución de células GFAP+ en hipoxia, y el aumento paralelo de células nestina+. Durante la renormoxia se produce un fenómeno inverso (recuperación de la población de células GFAP+ y disminución del número de células nestina+). (E) Proliferación de progenitores GFAP+ o nestina+ del cuerpo carotídeo durante la hipoxia. Las medias del número de células, calculadas a partir de tres experimentos independientes, son: normoxia (3,6% GFAP+, BrdU+ de 111 células GFAP+; 5,7% nestina+, BrdU+ de 69 células nestina+), hipoxia 6 días (29,4% GFAP+, BrdU+ de 30 células GFAP+; 35,6% nestina+, BrdU+ de 247 células nestina+), hipoxia 16 días (64,3% GFAP+, BrdU+ de 25 células GFAP+; 57,8% nestina+, BrdU+ de 248 células nestina+).

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se relaciona, en general, con células madre adultas procedentes del cuerpo carotídeo (CC) (células madre de la invención), con células progenitoras derivadas de dichas células madre adultas (células proge-  
 5 nitoras de la invención), con células diferenciadas derivadas de dichas células madre o progenitoras de la invención (células diferenciadas de la invención), con poblaciones celulares aisladas que comprenden un conjunto de dichas células (población celular de la invención) con un método para su expansión (método de expansión de la invención), y con sus aplicaciones, entre las que se encuentran su empleo en terapia, en particular, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (e.g., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, etc.), o de enfermedades causadas por  
 10 lesiones isquémicas, traumáticas o autoinmunes del sistema nervioso.

*Definiciones*

A fin de facilitar la comprensión de la presente descripción, se explicará a continuación el significado de algunos  
 15 términos y expresiones utilizados en el contexto de esta invención. Se incluirán definiciones adicionales junto con la descripción cuando sea necesario.

El término “sujeto” tal como aquí se utiliza se refiere a un animal, preferentemente un mamífero incluido un no primate (e.g., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, ratones, etc.) y un primate (e.g., monos, seres humanos,  
 20 etc.). En una realización particular, dicho sujeto es un ser humano.

El término “célula madre adulta” hace referencia a una célula presente en un tejido diferenciado que presenta características de células madre. Una célula madre adulta es una célula indiferenciada que se halla en un tejido diferenciado y presenta capacidad de proliferación, auto-renovación y diferenciación a uno o más tipos celulares. Las  
 25 células madre adultas de la presente invención están presentes en el CC de un sujeto.

El término “célula progenitora derivada” (también denominadas en esta descripción como amplificadores transitorios, células amplificadoras transitorias, o progenitores intermedios) significa en esta descripción una célula proliferativa, proveniente de las células madre de la invención, obtenidas a partir del CC, con capacidad de diferenciación  
 30 hacia células diferenciadas del tejido, y más especializada que la célula madre.

El término “célula diferenciada o especializada derivada” significa en esta descripción una célula terminalmente especificada hacia la realización de una función concreta en el tejido, procedente de las células madre o progenitoras derivadas, y que posee poca o nula capacidad de proliferación o de diferenciación.  
 35

El término “célula inmortalizada reversiblemente” se refiere a una célula que, en un momento dado se encuentra en un estado inmortalizado pero que puede ser devuelta a un estado no-inmortalizado en un momento posterior, utilizando un proceso de inmortalización inverso.  
 40

El término “marcador de especialización o diferenciación” significa en esta descripción un marcador fenotípico que identifica a la “célula diferenciada o especializada” y la distingue de las células madre y progenitoras.  
 45

El término “medio de cultivo específico para células derivadas de cresta neural” (también denominado en esta descripción “medio CN”), significa en esta descripción un medio que contiene suero y una serie de factores tróficos que facilitan el crecimiento de progenitores del sistema nervioso periférico (SNP), derivados de la cresta neural (CN).  
 50

El término “molécula con actividad biológica” significa en esta descripción una molécula que tiene un efecto determinado sobre la biología de un grupo de células, e.g., afectar a su supervivencia o a su comportamiento proliferativo o de diferenciación.  
 55

El término “cantidad de células terapéuticamente efectiva” significa en esta descripción la cantidad de células necesaria para obtener un efecto beneficioso en el tratamiento de una determinada enfermedad a través de terapia celular.  
 60

El término “cultivo mixto” significa en esta descripción un cultivo de varios tipos celulares distintos presentes en la misma placa, y que pueden derivar, o no, unos de otros.  
 65

El término “cultivo puro” significa en esta descripción un cultivo con un solo tipo celular presente, o bien muy (sustancialmente) enriquecido en un solo tipo celular. En la práctica es extremadamente difícil obtener cultivos 100% puros, aunque sí pueden obtenerse muy enriquecidos. En una realización particular, se puede llegar a obtener cultivos de más de un 70% de pureza de células madre de la invención [GFAP+/TH-/nestina-] o de unas células diferenciadas de la invención [TH+/nestina-] mediante separación por citometría de flujo utilizando marcadores fluorescentes específicos.  
 70

El término “mapeo del linaje celular” significa en esta descripción el seguimiento de un linaje celular en el sentido de marcar a la célula progenitora para posteriormente hacer un seguimiento del marcaje y un estudio de las células que hayan derivado de dichas célula progenitora y, por tanto, estén marcadas.  
 75

Las “enfermedades neurodegenerativas” son patologías que afectan al sistema nervioso (generalmente al sistema nervioso central) de causa conocida o desconocida y que cursan con muerte progresiva de neuronas por apoptosis o necrosis; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas enfermedades neurodegenerativas incluyen la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, etc.

Las “lesiones isquémicas” del sistema nervioso son lesiones producidas por falta de riego sanguíneo a una parte del cerebro, debido a que la arteria que irriga dicha zona se obstruye.

Las “lesiones traumáticas” del sistema nervioso se caracterizan por destrucción de neuronas o algunas de sus partes (axones, por ejemplo) debido, por ejemplo, a un trauma mecánico (e.g., las lesiones traumáticas medulares producidas tras accidentes de tráfico).

Las “lesiones inmunológicas” del sistema nervioso (e.g., la esclerosis múltiple, etc.), se producen por reacciones autoinmunes, tras la estimulación aberrante del sistema inmunitario.

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 puesta en práctica de la presente invención.

#### *Células y poblaciones celulares de la invención*

##### *Células madre de la invención*

En un aspecto, la invención se relaciona con una célula madre adulta aislada, procedente del CC (célula madre de la invención), caracterizada porque es positiva para el marcador fenotípico GFAP (proteína ácida fibrilar de origen glial) y negativa para los marcadores fenotípicos TH y nestina. Por tanto, dicha célula madre de la invención se obtiene a partir del CC y posee un fenotipo GFAP+/TH-/nestina-.

El marcador GFAP es característico de las células gliales del cerebro, de las células de la glía periférica y de células “parecidas” a las gliales localizadas en diferentes órganos (como por ejemplo las células tipo II del cuerpo carotídeo). La GFAP es una proteína del citoesqueleto cuya función concreta se desconoce.

El marcador nestina es característico de diferentes tipos distintos de progenitores neurales en el sistema nervioso central, el periférico y en órganos “paraneurales”, tales como el CC. La función de la nestina se desconoce a ciencia cierta.

La TH es un marcador específico de varios subtipos distintos de células catecolaminérgicas. La función de la TH es actuar como catalizador de la primera reacción (hidroxilación de la tirosina) que convierte el aminoácido tirosina en un neurotransmisor del grupo de las catecolaminas (dopamina, noradrenalina o adrenalina).

Inicialmente, las células madre de la invención fueron identificadas mediante un procedimiento como el que se describe en el Ejemplo 2. Brevemente, CC de ratas adultas expuestas a hipoxia fueron enzimáticamente dispersados y las células sembradas en medio CN, en placas de cultivo tratadas para la no adhesión, con lo que se indujo el crecimiento en condiciones de flotación y la obtención de neuroesferas. Las neuroesferas son colonias procedentes de una sola célula (crecimiento clonal) que tiene las características de proliferar y auto-renovarse (son células madre). Al dispersar el cuerpo carotídeo y poner sus células en cultivo sólo las células madre (una pequeña población del total de células) tienen la capacidad de formar neuroesferas. A continuación, se analizaron las distintas células presentes en dichas neuroesferas mediante un protocolo inmunocitoquímico típico que comprendía incubar secciones finas de dichas neuroesferas previamente bloqueadas con una solución de bloqueo con los anticuerpos primarios (anti-GFAP, anti-TH y anti-nestina), posteriormente, con los anticuerpos secundarios correspondientes, y, finalmente, contratinción con DAPI (tiñe los núcleos celulares). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de unas células obtenidas a partir del CC de ratas sometidas a hipoxia que poseían un fenotipo GFAP+/TH-/nestina-. Estas células fueron analizadas posteriormente, observándose su capacidad de proliferación, auto-renovación y diferenciación (Ejemplo 2). Ensayos adicionales pusieron de manifiesto que dichas células madre del CC eran células sustentaculares de tipo glial (tipo II) (Ejemplo 3).

A la vista de la información facilitada por esta descripción, las células madre de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por cualquier persona experta en la materia a partir del CC de un sujeto. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero, tal como un roedor (e.g., una rata o un ratón) o un primate (e.g., un ser humano).

Los marcadores fenotípicos de las células madre de la invención pueden identificarse por cualquier técnica apropiada basada, normalmente, en una selección positivo/negativo. En una realización particular, pueden utilizarse anticuerpos, preferentemente, anticuerpos monoclonales, frente a dichos marcadores fenotípicos cuya presencia o ausencia en las células madre de la invención debe confirmarse con el fin de caracterizar las células madre de la invención mediante su perfil inmunocitoquímico, aunque también pueden utilizarse otras técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por tanto, en una realización particular, se utilizan anticuerpos monoclonales frente a GFAP

para analizar la presencia de dicho marcador en las células seleccionadas y anticuerpos monoclonales frente a TH y nestina para analizar la presencia de dichos marcadores en dichas células seleccionadas. Aquellas células que poseen un fenotipo GFAP+/TH-/nestina-, proceden de CC y tienen la capacidad de proliferar, auto-renovarse y diferenciarse a otros tipos celulares, constituyen las células madre de la invención. Dichos anticuerpos monoclonales son comerciales o pueden ser obtenidos por los expertos en la materia mediante procedimientos convencionales. En el apartado relativo a los Materiales y Métodos se describe una forma de llevar a cabo la caracterización inmunocitoquímica de distintos tipos de células.

Las células madre de la invención pueden ser expandidas *in vitro* puesto que poseen la capacidad de proliferación y auto-renovación. Brevemente, dichas células madre de la invención, una vez aisladas y caracterizadas, pueden mantenerse y proliferar *in vitro* en un medio de cultivo apropiado. En una realización particular, las células madre de la invención son crecidas en una superficie no adherente para permitir la formación de neuroesferas. Asimismo, en una realización particular, el medio de cultivo (definido anteriormente como medio CN) comprende, al menos, un factor de crecimiento seleccionado entre factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), incluyendo factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento de tipo insulina tipo I (IGF-I) y combinaciones de los mismos, preferentemente, FGF, en una concentración comprendida entre 10 y 40 ng/ml, preferentemente, 20 ng/ml. Alternativamente, el medio de cultivo puede contener además de FGF otros factores de crecimiento tales como EGF y/o IGF-1 en una concentración (cada uno de ellos) comprendida entre 10 y 40 ng/ml, preferentemente, 20 ng/ml. Dichos factores de crecimiento (FGF, EGF e IGF-1) pueden ser nativos o recombinantes, o, alternativamente también pueden utilizarse variantes funcionales de dichos factores de crecimiento (FGF, EGF e IGF-1) bien conocidas por los técnicos en la materia. En otra realización particular, el medio de cultivo contiene, como fuente principal de nutrientes, extracto de pollo embrionario en una concentración de al menos el 5% en peso del total del medio de cultivo, preferentemente entre el 5% y el 20%, y aun más preferentemente del 15%. Además, ventajosamente, con el fin de evitar contaminaciones, el medio de cultivo contiene antibióticos, e.g., penicilina y/o estreptomycin, en concentraciones típicas del 0,5 al 2% en peso respecto al total del medio de cultivo.

Si se desea, las células madre de la invención pueden expandirse clonalmente usando un procedimiento adecuado para clonar poblaciones celulares (Ejemplo 3). Alternativamente, puede recogerse una población de células madre de la invención y sembrar las células en placas separadas (o en los pocillos de una placa multi-pocillo). En otra realización alternativa, dichas células madre pueden subclonarse en una placa "multi-pocillo" en una relación estadística para facilitar la operación de colocar una única célula en cada pocillo (e.g., desde aproximadamente 0,1 a cerca de 1 célula/pocillo). Por supuesto, las células madre de la invención pueden clonarse a baja densidad (e.g., en una placa Petri) y aislarlas de otras células usando dispositivos apropiados (e.g., anillos de clonación). La población clonal puede expandirse en un medio de cultivo adecuado, e.g., un medio CN.

Las células aisladas pueden cultivarse hasta que su fenotipo de desarrollo pueda evaluarse. Las células madre de la invención tienen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, tales como a las células progenitoras de la invención (nestina+), por ejemplo, células tenue o débilmente positivas para GFAP y positivas para nestina (GFAP±/nestina+) o células negativas para GFAP y positivas para nestina (GFAP-/nestina+), así como a las células diferenciadas de la invención (nestina-/marcador de especialización+), por ejemplo, TH+ (células glómicas), SMA+ (células de músculo liso), etc. (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2). La capacidad de las células madre de la invención de diferenciarse en uno o más tipos celulares puede ensayarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Si se desea, la célula madre de la invención puede ser modificada genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma, etc. Uno de los posibles métodos usados para la obtención de células inmortalizadas, tanto estables como condicionales, se basa en la transfección estable de las células madre de la invención mediante lipofección con los plásmidos pEF321T o pRITA, respectivamente, tal como se menciona más adelante en relación con las células inmortalizadas de la invención.

#### *Células progenitoras de la invención*

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula progenitora adulta, aislada, derivada de dicha célula madre de la invención, en adelante "célula progenitora de la invención", caracterizada porque es positiva para el marcador fenotípico nestina; es decir, la célula progenitora de la invención procede de la célula madre de la invención, es decir, del CC, y posee un fenotipo nestina+. En una realización particular dicha célula progenitora de la invención es tenue o débilmente positiva para el marcador fenotípico GFAP y positiva para el marcador fenotípico nestina [GFAP±/nestina+], mientras que, en otra realización particular, dicha célula progenitora de la invención es negativa para el marcador fenotípico GFAP y positiva para el marcador fenotípico nestina [GFAP-/nestina+]. Existen células GFAP-/nestina+ que son progenitores neurales pero con origen y propiedades (en cuanto al tipo de células a las que se diferencian) diferentes de las descubiertas en el CC, tales como las células GFAP-/nestina+, procedentes de cerebro y estriado, descritas en la solicitud de patente norteamericana US 2003/0095956, que difieren de las células progenitoras de la invención no solo en el origen (cerebro o estriado vs. CC) sino en que, además, carecen de la propiedad de diferenciarse a células glómicas (TH+ y sensibles a hipoxia e hipoglucemia), propiedad que presentan las células progenitoras de la invención.

Como se ha mencionado previamente, en una realización particular la célula progenitora de la invención es tenue o débilmente positiva para el marcador fenotípico GFAP y positiva para el marcador fenotípico nestina, es decir, presenta



un fenotipo GFAP±/nestina+; esto parece ser debido, entre otras posibles razones, a que, a medida que la célula madre de la invención [GFAP+/nestina-] se va diferenciando en la célula progenitora de la invención, va adquiriendo el fenotipo nestina+ y va perdiendo el fenotipo GFAP, por lo que dependiendo del momento de su desarrollo pueden observarse células progenitoras de la invención que presentan un fenotipo tenue o débilmente positivo para GFAP.

5

Las células progenitoras de la invención pueden obtenerse mediante un procedimiento como el que se describe en el Ejemplo 2. Brevemente, CC de ratas adultas expuestas a hipoxia fueron enzimáticamente dispersados y las células sembradas en medio CN, en placas de cultivo tratadas para la no adhesión, para obtener neuroesferas. El análisis inmunocitoquímico de secciones finas de dichas neuroesferas con anticuerpos anti-GFAP y anti-nestina y contratinción con DAPI puso de manifiesto la existencia de células con un fenotipo GFAP±/nestina+ y células con un fenotipo GFAP-/nestina+ en el núcleo central de dichas neuroesferas obtenidas a partir de células madre del CC de ratas sometidas a hipoxia (células progenitoras de la invención). Estas células fueron analizadas posteriormente, observándose su capacidad de proliferación, auto-renovación y diferenciación (Ejemplo 2).

10

15

A la vista de la información facilitada por esta descripción, las células progenitoras de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por cualquier persona experta en la materia a partir del CC, o de células madre del CC, de un sujeto. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero, tal como un roedor (e.g., una rata o un ratón) o un primate (e.g., un ser humano).

20

Los marcadores fenotípicos de las células progenitoras de la invención pueden identificarse por cualquier técnica apropiada tal como se ha mencionado previamente. En una realización particular, pueden utilizarse anticuerpos, preferentemente, anticuerpos monoclonales, frente a dichos marcadores fenotípicos cuya presencia o ausencia en las células progenitoras de la invención debe confirmarse con el fin de caracterizar las células progenitoras de la invención mediante su perfil inmunocitoquímico, aunque también pueden utilizarse otras técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por tanto, en una realización particular, se utilizan anticuerpos monoclonales frente a GFAP para analizar la presencia (tenue) o ausencia de dicho marcador en las células seleccionadas y anticuerpos monoclonales frente a nestina para analizar la presencia de dicho marcador en dichas células seleccionadas. Aquellas células que poseen un fenotipo GFAP±/nestina+ o GFAP-/nestina+, proceden del CC, o de células madre del CC, y tienen la capacidad de proliferar, auto-renovarse y diferenciarse a otros tipos celulares, constituyen las células progenitoras de la invención. Dichos anticuerpos monoclonales son comerciales o pueden ser obtenidos por los expertos en la materia mediante procedimientos convencionales. En el apartado relativo a los Materiales y Métodos se describe una forma de llevar a cabo la caracterización inmunocitoquímica de distintos tipos de células.

25

30

35

Las células progenitoras de la invención pueden ser expandidas *in vitro* puesto que poseen la capacidad de proliferación y auto-renovación. Brevemente, dichas células progenitoras de la invención, una vez aisladas y caracterizadas, pueden mantenerse y proliferar *in vitro* en un medio de cultivo apropiado. En una realización particular, las células progenitoras de la invención son crecidas en una superficie no adherente para permitir la formación de neuroesferas. Asimismo, en una realización particular, el medio de cultivo (definido anteriormente como medio CN) comprende, al menos, un factor de crecimiento seleccionado entre FGF, incluyendo bFGF, EGF, IGF-I y combinaciones de los mismos, preferentemente, FGF, en una concentración comprendida entre 10 y 40 ng/ml, preferentemente, 20 ng/ml. Alternativamente, el medio de cultivo puede contener además de FGF, EGF y/o IGF-1, en una concentración (cada uno de ellos) comprendida entre 10 y 40 ng/ml, preferentemente, 20 ng/ml. Dichos factores de crecimiento (FGF, EGF e IGF-1) pueden ser nativos o recombinantes, o, alternativamente también pueden utilizarse variantes funcionales de dichos factores de crecimiento (FGF, EGF e IGF-1) bien conocidas por los técnicos en la materia. En otra realización particular, el medio de cultivo contiene, como fuente principal de nutrientes, extracto de pollo embrionario en una concentración de al menos el 5% en peso del total del medio de cultivo, preferentemente entre el 5% y el 20%, y aun más preferentemente del 15%. Además, ventajosamente, con el fin de evitar contaminaciones, el medio de cultivo contiene antibióticos, e.g., penicilina y/o estreptomycin, en concentraciones típicas del 0,5 al 2% en peso respecto al total del medio de cultivo.

40

45

50

Si se desea, las células progenitoras de la invención pueden expandirse clonalmente usando un procedimiento adecuado para clonar poblaciones celulares. Brevemente, las neuroesferas obtenidas en el cultivo primario pueden disociarse mecánicamente o enzimáticamente hasta célula única, y estas células volver a cultivarse en medio CN y condiciones no adherentes, para su expansión secundaria.

55

Las células progenitoras de la invención tienen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, tales como a las células diferenciadas de la invención (nestina-/marcador de especialización+), e.g., células nestina-/TH+ (células glómicas), células nestina-/SMA+ (células de músculo liso), etc. (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2). La capacidad de las células madre de la invención de diferenciarse en uno o más tipos celulares puede ensayarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

60

Si se desea, la célula progenitora de la invención puede ser modificada genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma, etc. Uno de los posibles métodos usados para la obtención de células inmortalizadas, tanto estables como condicionales, se basa en la transfección estable de las células progenitoras de la invención mediante lipofección con los plásmidos pEF321T o pRITA, respectivamente, tal como se menciona más adelante en relación con las células inmortalizadas de la invención.

65

*Células diferenciadas de la invención*

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula diferenciada, adulta, derivada de cualquiera de los tipos celulares anteriores (es decir, de la célula madre de la invención o de la célula progenitora de la invención), en adelante, “célula diferenciada de la invención”, caracterizada porque es negativa para el marcador fenotípico nestina y es positiva para un marcador de especialización (MdeE); es decir, la célula diferenciada de la invención procede de la célula madre de la invención o de la célula progenitora de la invención, es decir, del CC, y posee un fenotipo nestina-/MdeE+.

Las células diferenciadas de la invención pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende cultivar las células madre de la invención y/o las células progenitoras de la invención bajo condiciones que permiten la diferenciación de dichas células a las células diferenciadas deseadas. A la vista de la información facilitada por esta descripción, las células diferenciadas de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por cualquier persona experta en la materia a partir del CC, o de células madre del CC, o de células progenitoras derivadas de dichas células madre del CC, de un sujeto. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero, tal como un roedor (e.g., una rata o un ratón) o un primate (e.g., un ser humano). Los marcadores fenotípicos de las células diferenciadas de la invención pueden identificarse por cualquier técnica apropiada tal como se ha mencionado previamente, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, frente a dichos marcadores fenotípicos cuya presencia o ausencia en las células diferenciadas de la invención debe confirmarse, aunque también pueden utilizarse otras técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

En una realización particular, dicho MdeE es la tirosina hidroxilasa (TH) y dicha célula diferenciada de la invención posee un fenotipo nestina-/TH+ (célula glómica). Brevemente, dichas células diferenciadas (células glómicas nestina-/TH+) pueden obtenerse mediante un procedimiento como el descrito en el Ejemplo 2. Brevemente, CC de ratas adultas expuestas a hipoxia fueron enzimáticamente dispersados y las células sembradas en medio CN, en placas de cultivo tratadas para la no adhesión, con lo que se obtuvieron neuroesferas que, a diferencia de las neuroesferas derivadas del SNC y del SNP (esféricas, en general) presentaban una o dos proyecciones de forma característica (Fig. 3A). El análisis inmunocitoquímico de secciones finas de dichas neuroesferas con anticuerpos anti-nestina y anti-TH y contratinción con DAPI puso de manifiesto la existencia de agregados de células diferenciadas, con un fenotipo nestina-/TH+, en las proyecciones glomerulares, unidas al núcleo central a través de un estrecho filamento de tejido, que, al cabo de varias semanas en cultivo, crecen hasta alcanzar el tamaño de un CC adulto (Fig. 3C).

En otra realización particular, dicho MdeE es la actina de músculo liso (SMA) y dicha célula diferenciada de la invención posee un fenotipo nestina-/SMA+ (un tipo celular típicamente derivado de cresta neural). Brevemente, dichas células diferenciadas (nestina-/SMA+) pueden obtenerse mediante un procedimiento como el descrito en el Ejemplo 2. Brevemente, se re-sembraron neuroesferas (obtenidas a partir del CC de ratas adultas expuestas a hipoxia) en cultivo en un sustrato adherente. El análisis inmunocitoquímico de las células resultantes con anticuerpos anti-nestina y anti-SMA y contratinción con DAPI puso de manifiesto la existencia de células diferenciadas, con un fenotipo nestina-/SMA+ (Fig. 3D).

Si se desea, la célula diferenciada de la invención puede ser modificada genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma, etc. Uno de los posibles métodos usados para la obtención de células inmortalizadas, tanto estables como condicionales, se basa en la transfección estable de las células progenitoras de la invención mediante lipofección con los plásmidos pEF321T o pRITA, respectivamente, tal como se menciona más adelante en relación con las células inmortalizadas de la invención.

*Células inmortalizadas de la invención*

Las células madre de la invención, las células progenitoras de la invención y/o las células diferenciadas de la invención, en adelante “células de la invención”, si se desean, pueden ser sometidas a un proceso de inmortalización reversible.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula inmortalizada de forma reversible, en adelante “célula inmortalizada de la invención”, siendo dicha célula una célula de la invención, es decir, una célula madre de la invención, una célula progenitora de la invención o una célula diferenciada de la invención.

En una realización particular, las células de la invención se someten a un proceso de inmortalización reversible con el fin de obtener células de la invención inmortalizadas reversiblemente, funcionales, que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, e.g., para promover la regeneración de células nerviosas implantando dichas células, o preferentemente, células diferenciadas derivadas de dichas células madre, en aquellas regiones del SNC o del SNP en las que se ha producido el daño.

Tal como aquí se utiliza, el término “inmortalización” o “inmortalizada” se refiere a una célula, o a un proceso para la creación de una célula, que proliferará indefinidamente en cultivo evitando la entrada en senescencia. Según la presente invención, la inmortalización se refiere a un proceso por el que un cultivo celular es transformado de modo que las células se comporten en algunos aspectos como células tumorales, en particular, en lo relativo a las características proliferativas de las células tumorales. Así, una “célula inmortalizada reversiblemente” se refiere a una célula que, en

un momento dado se encuentra en un estado inmortalizado pero que puede ser devuelta a un estado no-inmortalizado en un momento posterior, utilizando un proceso de inmortalización inverso.

5 En una realización particular, dichas células de la invención pueden ser inmortalizadas reversiblemente mediante un procedimiento que comprende inmortalizar células de la invención mediante transformación con un vector que comprende un “polinucleótido retirable” que contiene un oncogén (o una combinación de oncogenes) para evitar la entrada en senescencia, tales como el gen que codifica el brazo largo del antígeno T del virus SV40, el gen que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa, el gen que codifica la proteína Bmi-1, etc., con lo que se producen células de la invención inmortalizadas; crecer dichas células de la invención inmortalizadas; seleccionar las líneas celulares clonales de células de la invención que mantienen las propiedades funcionales de las células de la invención, y (e) retirar el oncogén (o combinación de oncogenes) de las células de la invención inmortalizadas.

15 A modo ilustrativo, entre los métodos que potencialmente pueden ser utilizados para obtener células inmortalizadas de la invención, tanto estables como condicionales, se encuentran los métodos basados en la transfección estable de las células dispersas de cultivo primario de CC, mediante lipofección con los plásmidos pEF321T o pRITA, respectivamente.

20 El plásmido pEF321T [Kim *et al.*, 1990, Gene 91, 217-223] expresa el brazo largo del antígeno T del virus SV40, bajo el promotor ubicuo del factor de elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ), capaz de inmortalizar aquellas células que lo expresan. Este antígeno activa una serie de proto-oncogenes que convierten la célula en tumoral. Posteriormente se caracterizarán mediante técnicas de biología molecular, histología e inmuno-histoquímica los diferentes clones obtenidos, con el objetivo de identificar qué tipo celular de los que componen el CC se ha inmortalizado en cada uno de ellos.

25 El plásmido pRITA (Reversible Immortalization with T antigen) [Tobias M. *et al.*, 2004, Nucleic Acids Research, 32, 5529 -5538] posee un promotor bidireccional  $P_{bTA}$ , al que se une el transactivador tTA que responde a doxiciclina. Este activador permite la expresión del ARNm del antígeno T del SV40, y, por tanto, la proliferación celular, en presencia de doxiciclina, transformando las células en inmortalizadas reversiblemente. En ausencia de doxiciclina se expresa el ARNm del represor rtTA2M2 (represor del antígeno T del SV40) haciendo reversible la inmortalización, y, por tanto, frenando la proliferación celular. La expresión del represor, a su vez, va ligada a la del gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) y a la de un cassette de resistencia a neomicina que permiten seleccionar los clones con neomicina y comprobar la reversibilidad de la inmortalización con un microscopio de fluorescencia. Se seleccionan distintos clones antes de revertir la proliferación y se caracterizan mediante técnicas de biología molecular, inmunohistoquímica y electrofisiología. Los clones con células GFAP+ (células madre de la invención) se pueden identificar por PCR y selección. Asimismo, si se desea, en aquellos clones que posean marcadores típicos de células glómicas (TH+) y que produzcan GDNF, se puede revertir el proceso de proliferación, retirando la doxiciclina del medio y añadiendo neomicina, y, si se desea, se utilizan en implantes intraestriatales de modelos animales de la enfermedad de Parkinson.

40 En una realización particular, dichas células de la invención inmortalizadas reversiblemente, son células madre de la invención inmortalizadas reversiblemente, o células progenitoras de la invención inmortalizadas reversiblemente, o células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente, ventajosamente, células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente.

45 En otra realización particular, la invención proporciona una combinación de dos o más tipos de células de la invención inmortalizadas reversiblemente, es decir, de células madre de la invención inmortalizadas reversiblemente y/o células progenitoras de la invención inmortalizadas reversiblemente y/o células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente.

#### *Población celular de la invención*

50 En otro aspecto, la invención se relaciona con una población, aislada, de células derivadas de CC, en adelante “población celular de la invención”, que comprende un conjunto de células seleccionadas del grupo formado por las células madre de la invención, las células progenitoras de la invención, las células diferenciadas de la invención, las células inmortalizadas de la invención, y combinaciones de las mismas. Las características de dichas células ya han sido mencionadas previamente. Las células de la invención pueden conservarse a largo plazo en medio CN con alto contenido de suero (típicamente mayor del 20%) y un agente de criopreservación, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), en una cantidad de aproximadamente un 10% en peso, mediante su congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

60 Dicha población celular de la invención, si se desea, puede encontrarse en un banco de células para trasplante. En una realización particular, dicho banco de células comprende una pluralidad de células de la invención inmortalizadas reversiblemente, preferentemente, de células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente, homocigotas para al menos uno o más genes de antígenos críticos, es decir, genes que codifican antígenos de histocompatibilidad (e.g., un alelo del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) presente en la población humana). A partir de dicho banco pueden seleccionarse las células de la invención inmortalizadas reversiblemente homocigotas para uno o más alelos de antígenos de histocompatibilidad compatibles con el alelo del CMH de un sujeto necesitado de trasplante.

65 Si se desea, la población celular de la invención puede ser mantenida congelada bajo condiciones que no afecten ni comprometan su viabilidad después de su reconstitución.

## ES 2 326 108 B1

### *Expansión de células madre y progenitoras de la invención*

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la expansión de dichas células madre de la invención o de dichas células progenitoras de la invención, en adelante “método de expansión de la invención”, que comprende cultivar dichas células madre o progenitoras de la invención bajo condiciones de hipoxia en un medio de cultivo específico para la cresta neural.

En una realización particular, dichas células madre o progenitoras de la invención son cultivadas en una superficie no adherente para permitir la formación de neuroesferas.

Dicho medio de cultivo específico para la cresta neural comprende un medio de cultivo, una fuente de nutrientes, antibióticos y un factor de crecimiento. En una realización particular, dicho medio de cultivo es DMEM:F-12; dicha fuente de nutrientes comprende un extracto de embrión de pollo, preferentemente, embrionario, en una concentración de al menos el 5% del total del medio de cultivo, preferentemente entre el 5% y el 20%, más preferentemente del 15%; dichos antibióticos se seleccionan entre penicilina, estreptomina y sus mezclas, en concentraciones típicas del 0,5 al 2% en peso respecto al total del medio de cultivo; y dicho factor de crecimiento se selecciona entre FGF, incluyendo bFGF, o una variante funcional del mismo, IGF-I o una variante funcional del mismo, EGF o una variante del mismo, y una combinación de dichos factores, en una concentración (cada uno de ellos) comprendida entre 10 y 40 ng/ml, preferentemente, 20 ng/ml. Dichos factores de crecimiento (FGF, EGF e IGF-1) pueden ser nativos o recombinantes, aunque, alternativamente, también pueden utilizarse variantes funcionales de dichos factores de crecimiento bien conocidas por los técnicos en la materia. En una realización concreta, dicho medio de cultivo específico para la cresta neural (medio CN) comprende bFGF recombinante humano, IGF-I recombinante humano y EGF recombinante humano. Adicionalmente, si fuera necesario, el medio de cultivo específico para la cresta neural puede suplementarse con una fuente de nitrógeno y con B27.

El cultivo se lleva a cabo en condiciones de hipoxia, es decir, en presencia de una concentración de oxígeno inferior al 15%, preferentemente entre 1-10%, más preferentemente entre 2-5% y aun más preferentemente del 3%.

Asimismo, dicho cultivo se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 35°C y 39°C, preferentemente a 37°C.

Mediante el método de expansión de la invención se puede obtener una cantidad sustancial, tal como una cantidad terapéuticamente efectiva, bien de cultivo puro de cualquiera de dichos tipos celulares mencionados (células madre de la invención o células progenitoras de la invención) o bien de cultivo mixto de dichos tipos celulares.

### *Aplicaciones*

#### *Composición farmacéutica*

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, o combinaciones de las mismas, o de dichas células inmortalizadas de la invención, o de dicha población celular de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las características propias de dichas células y poblaciones celulares, incluyendo las de las células inmortalizadas reversiblemente, se han descrito previamente.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dichas células diferenciadas de la invención, o de dichas células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente, o de una población celular de la invención que comprende dichas células diferenciadas de la invención y/o dichas células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente.

Tal y como aquí se utiliza, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, o de combinaciones de las mismas, o de dichas células inmortalizadas de la invención, o de dicha población celular de la invención, que debe contener la composición farmacéutica de la invención que es capaz de producir el efecto terapéutico deseado; en general, dicha cantidad terapéuticamente efectiva vendrá determinada, entre otros factores, por las propias características de las células y el efecto terapéutico deseado que se persigue. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de células de la invención que debe administrarse dependerá, entre otros factores, del grado de enfermedad a tratar, de las propias características del sujeto, de la zona afectada, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta descripción deben tenerse en cuenta sólo como guía para el experto en la materia, que debe ajustar dicha dosis dependiendo de los factores anteriormente descritos. Como ejemplo ilustrativo y no limitativo, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse como una dosis única, que contenga aproximadamente entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^9$ , preferentemente entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$ , más preferentemente entre  $1 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, o combinaciones de las mismas, o de células inmortalizadas de la invención. La dosis puede repetirse, dependiendo del estado y evolución del paciente, en intervalos temporales de días, semanas o meses que debe establecer el especialista en cada caso.

Las células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, las células inmortalizadas de la invención, así como las células presentes en la población celular de la invención, pueden ser células de origen autólogo, alogénico o xenogénico. En una realización particular, dichas células son de origen autólogo y son aisladas del CC del sujeto al que se van a administrar, reduciendo así las complicaciones potenciales asociadas con las respuestas antigénicas y/o inmunogénicas a dichas células.

Si se desea, las células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, o combinaciones de las mismas, las células inmortalizadas de la invención así como las de la población celular de la invención pueden purificarse, tal como se ha mencionado anteriormente, usando una selección de células positivas y/o negativas por medio de anticuerpos a fin de seleccionar un único tipo celular o de enriquecer la población celular para aumentar la eficacia, reducir la morbilidad o facilitar el procedimiento. En una realización particular, dicha composición farmacéutica de la invención comprende mayoritariamente células diferenciadas de la invención, e.g., células glómicas (TH+/nestina-), o células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente, e.g., células gnómicas inmortalizadas reversiblemente, o una población celular de la invención sustancialmente enriquecida en dichas células, e.g., células glómicas.

De acuerdo con la invención, las células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, las células de la invención inmortalizadas reversiblemente, así como las células de la población celular de la invención, pueden administrarse al sujeto sin necesidad de tener que aplicarlas un procesamiento adicional o bien después de aplicar procesos adicionales para purificar dichas células. Asimismo, dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, dichas células inmortalizadas de la invención, así como las células de la población celular de la invención, pueden ser administradas bien de forma aislada o bien junto con otras poblaciones celulares, e.g., junto con otras células de la región del SNC o del SNP en donde se van a implantar.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” tal como aquí se utiliza se refiere a que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y en humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, excipiente, portador o adyuvante con el que se debe administrar las células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención, las células inmortalizadas de la invención, así como las células de la población celular de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con las células. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho vehículo incluyen cualquier vehículo fisiológicamente compatible, por ejemplo, soluciones isotónicas (e.g., solución salina estéril (0,9% NaCl), solución salina tamponada con fosfatos (PBS), solución Ringer-lactato, etc.), opcionalmente suplementadas con suero, preferiblemente con suero autólogo; medios de cultivo (e.g., DMEM, RPMI, McCoy, etc.); o, preferiblemente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso, tal como colágeno, colagen-glicosamino-glicano, fibrina, cloruro de polivinilo, poliaminoácidos, tales como polilisina, o poliornitina, hidrogeles, agarosa, sulfato de dextrano silicona. Asimismo, si se desea, el medio de soporte puede, en realizaciones específicas, contener factores de crecimiento u otros agentes. Si el soporte es sólido, semisólido, o gelatinoso, las células pueden ser introducidas en una fase líquida del vehículo que es tratada posteriormente de forma tal que se convierte en una fase más sólida. En algunas realizaciones de la invención en las que el vehículo tenga una estructura sólida, dicho vehículo podrá ser conformado de acuerdo con la forma de la lesión.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, puede contener también, cuando sea necesario, aditivos para aumentar y/o controlar el efecto terapéutico deseado de las células, e.g., agentes tamponantes, tensioactivos, conservantes, etc. También, para estabilizar la suspensión celular, es posible añadir quelantes de metales. La estabilidad de las células en el medio líquido de la composición farmacéutica de la invención puede mejorarse mediante la adición de sustancias adicionales, tales como, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, etcétera. Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención son conocidas, en general, por las personas expertas en la técnica y se usan normalmente en la elaboración de las composiciones celulares. Se describen ejemplos de los vehículos farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin. Puede encontrarse información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de tecnología farmacéutica (es decir, farmacia galénica).

La composición farmacéutica de la invención se administrará en una forma farmacéutica de administración apropiada. Para ello, la composición farmacéutica de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. La formulación se adecuará al modo de administración. En una forma de realización específica la composición farmacéutica se prepara en un modo de dosificación líquido, sólido o semisólido, e.g., en forma de suspensión, para ser implantada, inyectada o perfundida al sujeto en necesidad de tratamiento. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, incluyen la formulación de la composición farmacéutica de la invención en una suspensión estéril con un vehículo farmacéuticamente aceptable, e.g., una solución isotónica, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfatos (PBS), o cualquier otro vehículo apropiado aceptable farmacéuticamente, para la administración a un sujeto vía parenteral, aunque también pueden utilizarse otras vías de administración.

La administración de la composición farmacéutica de la invención al sujeto que la necesita se llevará a cabo utilizando medios convencionales. En una realización particular, dicha composición farmacéutica de la invención se puede administrar al sujeto por vía parenteral utilizando dispositivos apropiados tales como jeringas, catéteres, trocates, cánulas, etc. En todos los casos, la composición farmacéutica de la invención se administrará utilizando los equipos, aparatos y dispositivos adecuados a la administración de composiciones celulares y conocidos por el experto en la técnica.

En otra realización, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (e.g., por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula apropiada, por perfusión (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios descritos en esta patente o conocidos en la técnica. En una realización preferida, se efectuará una administración directa de la composición farmacéutica de la invención en la zona dañada del SNC o del SNP.

La composición farmacéutica de la invención se puede almacenar hasta el momento de su aplicación con los procedimientos convencionales conocidos por las personas expertas en la técnica. Para el almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas), la composición farmacéutica de la invención puede almacenarse a temperatura ambiente o por debajo de ésta en un recipiente sellado complementándola o no con una solución nutriente. El almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se realiza preferentemente a 2-8°C, y la composición farmacéutica de la invención comprende, además, una solución iso-osmótica y tamponada en un contenedor compuesta de o revestida de material que previene la adhesión celular. El almacenamiento a más largo plazo se lleva a cabo preferentemente por medio de criopreservación adecuada y almacenamiento en condiciones que promueven la retención de la función celular.

En una forma de realización concreta, la composición farmacéutica de la invención puede utilizarse en una terapia combinada. En una forma de realización concreta preferida, dicha composición farmacéutica se administra en combinación con una composición farmacéutica adicional para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o para el tratamiento de enfermedades causadas por lesiones isquémicas, traumáticas o autoinmunes del sistema nervioso. Así, las células de la invención pueden utilizarse como un tratamiento único o como un tratamiento combinado con otro tratamiento convencional para la terapia de dichas enfermedades.

La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse en una terapia combinada con medicación adicional útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o para el tratamiento de enfermedades causadas por lesiones isquémicas, traumáticas o autoinmunes del sistema nervioso, tal y como se ha descrito previamente. Dichos medicamentos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o se pueden suministrar, de forma alternativa, en forma de una composición aparte para la administración simultánea o sucesiva (secuencial en el tiempo) con respecto a la administración de la composición farmacéutica de la invención. En una forma de realización concreta, dicha composición farmacéutica adicional se administra de forma simultánea o secuencial a la composición farmacéutica que comprende las células madre, progenitoras y/o diferenciadas de la invención, o la población celular de la invención, espaciada en el tiempo, en cualquier orden, es decir primero puede administrarse la composición farmacéutica de la invención, luego los otros medicamentos adicionales u otra composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o para el tratamiento de enfermedades causadas por lesiones isquémicas, traumáticas o autoinmunes del sistema nervioso, o primero pueden administrarse los otros medicamentos adicionales u otra composición farmacéutica para el tratamiento de dichas enfermedades y luego la composición farmacéutica de la invención. Alternativamente, puede mezclarse cualquiera de estos dos componentes en la misma composición y administrarlos conjuntamente. En otra forma de realización alternativa, dicha composición farmacéutica de la invención y otros medicamentos adicionales u otra composición farmacéutica para el tratamiento de dichas enfermedades neurodegenerativas o para el tratamiento de enfermedades causadas por lesiones isquémicas, traumáticas o autoinmunes del sistema nervioso, se administran simultáneamente.

#### *Usos terapéuticos de las células y población celular de la invención*

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención o combinaciones de las mismas, o de dichas células inmortalizadas de la invención, o de dicha población celular de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en el tratamiento de lesiones isquémicas del sistema nervioso, en el tratamiento de lesiones traumáticas del sistema nervioso, o en el tratamiento de lesiones autoinmunes del sistema nervioso.

En una realización particular, dichas células son células diferenciadas de la invención, o células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente, o de una población celular de la invención que comprende dichas células diferenciadas de la invención y/o dichas células diferenciadas de la invención inmortalizadas reversiblemente. Aunque dichas células pueden ser de origen autólogo, alogénico o xenogénico, en una realización particular, dichas células son de origen autólogo y se aíslan del CC del sujeto al que se van a administrar, reduciendo así las complicaciones potenciales asociadas con las respuestas antigénicas y/o inmunogénicas a dichas células. Asimismo, en una realización particular, dichas células se encuentran en forma de neuroesferas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de tratamiento de una enfermedad, preferentemente una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad causada por una lesión isquémica, traumática o autoinmune del sistema nervioso que comprende injertar (implantar o transplantar) en las regiones afectadas por dicha enfermedad, una cantidad terapéuticamente efectiva de dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención o combinaciones de las mismas, o de dichas células inmortalizadas de la invención, o de dicha población celular de la invención, preferentemente células diferenciadas de la invención, opcionalmente inmortalizadas reversiblemente. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

## ES 2 326 108 B1

Asimismo, en una realización particular, dichas células son células glómicas (nestina-/TH+), preferentemente, células glómicas en forma de neuroesferas.

5 El injerto de dichas células y/o neuroesferas puede ser realizado por técnicas conocidas en el estado de la técnica, aunque preferentemente se implantarán mediante cirugía estereotáxica utilizando una cánula rígida. La localización y cantidad de tejido (células y/o neuroesferas) a transplantar dependerá del tipo y grado de afectación de la enfermedad. En el caso de enfermos de Parkinson los implantes celulares se harán preferentemente de forma bilateral en el caudado y/o putamen. Preferentemente, se implantarán como mínimo  $10^6$  células en cada lado del cerebro.

10 Dichas células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención así como dichas células inmortalizadas de la invención, y dicha población celular de la invención, pueden ser obtenidas mediante la metodología descrita previamente.

### *Método para evaluar in vitro la respuesta celular a un compuesto potencialmente terapéutico*

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para evaluar *in vitro* la respuesta celular a un compuesto potencialmente terapéutico que comprende poner en contacto un cultivo que comprende células madre, progenitoras o diferenciadas de la invención o combinaciones de las mismas, y/o células inmortalizadas de la invención, y/o una población celular de la invención con un compuesto potencialmente terapéutico y evaluar los efectos causados por dicho compuesto sobre las células presentes en dicho cultivo.

20 En una realización particular, dichas células son células diferenciadas de la invención, en particular, células diferenciadas a células glómicas (nestina-/TH+), opcionalmente, en forma de neuroesferas.

25 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

### **Ejemplos**

30 A continuación se detallan los materiales y métodos que han sido empleados para el desarrollo de la presente invención, así como sus ejemplos de realización. Dichos ejemplos no limitan la invención, sino que su finalidad es ilustrarla, poniendo de manifiesto la presencia de células madre en el cuerpo carotídeo, el modo de promover su proliferación y diferenciación y los usos de las mismas.

### *Material y métodos*

#### 35 1. *Animales*

Las ratas Wistar silvestres (Charles River, Barcelona, España), los ratones C57BI16 silvestres (Charles River, Barcelona, España) y los ratones transgénicos utilizados para estos estudios se mantuvieron y trataron siguiendo las directrices definidas por la Comisión Europea (861609/EEC). Los ratones transgénicos (GFAP-Cre/LacZ floxeados, GDNF/LacZ) se obtuvieron de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), mientras que los ratones Wnt1-Cre/LacZ floxeados fueron cedidos por el Dr. Andrew McMahon (Dpto. de Biología Molecular y Celular, Universidad de Harvard, EEUU). El genotipado de los animales transgénicos se llevó a cabo por PCR siguiendo las indicaciones de los investigadores que los han hecho.

#### 45 2. *Tratamientos de hipoxia crónica in vivo y suministro de BrdU*

Los ratones C57BI16 silvestres de 2 a 3 meses de edad se expusieron de forma crónica a un ambiente aéreo con 10% de oxígeno, utilizando para ello cámaras herméticas especiales, capaces de controlar los niveles de  $O_2$  y  $CO_2$ , y de monitorizar la temperatura y la humedad (COY Laboratory Products INC., Grass Lake, MI). Para poner de manifiesto los eventos de proliferación en el cuerpo carotídeo, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 50 mg/kg de 5-bromo-2-desoxiuridina [BrdU] (Sigma) cada 7 días durante toda la duración del experimento. Además, el agua de beber se suplementó con 1 mg/ml de BrdU. El procesamiento de los animales tras el tratamiento hipóxico/normóxico consistió en la fijación de todos los tejidos por perfusión intracardiaca con el fijador paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma). A continuación, se extrajeron las bifurcaciones carotídeas y se post-fijaron durante dos horas en PFA. Tras una crioprotección de 12 horas en sacarosa al 30% (Sigma), las bifurcaciones se incluyeron en el compuesto OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), una formulación a base de glicoles solubles en agua y resinas, para generar bloques y poder cortar las bifurcaciones en un criostato, y obtener rodajas de cuerpo carotídeo de 10 micras de grosor.

#### 60 3. *Inmunohistoquímica*

Para detectar el BrdU por inmunohistoquímica en las secciones de tejido, se desnaturaliza el ADN con HCl 2M durante 45 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se neutraliza con borato sódico 0,1 M. Posteriormente, las secciones se prebloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con solución bloqueante (tampón fosfato más 10% de suero de cabra, 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA), y 0,3% de Triton X-100 (Sigma)). El anticuerpo primario frente a BrdU (1:100, Accurate Chemical, Westbury, NY) se incubó sobre el tejido toda la noche a 4°C, seguido de una incubación de 4 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína (1:200, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Otros anticuerpos utilizados, siguiendo el mismo protocolo que para el BrdU pero

sin los pasos de desnaturalización/renaturalización del ADN, fueron: anticuerpo anti-TH de ratón hecho en conejo (1:1000, Pel-Freez, Roger, AR), y anticuerpo anti-GFAP de ratón también hecho en conejo (1:500, DAKO Cytomation, Fort Collins, CO), ambos seguidos de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 568 (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR). Finalmente, los tejidos se tiñen con 2,5 mg/ml de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol [DAPI] (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente para marcar los núcleos, previamente al montaje con 70% de glicerol hecho en fosfato salino tamponado [PBS]. En estos ensayos, las células TH+ eran observadas de color rojo, las BrdU+ en verde y las DAPI+ en azul.

#### 4. *Disociación de los cuerpos carotídeos a célula única*

Los cuerpos carotídeos de las ratas Wistar de 20 días de edad se diseccionaron y se colocaron en tampón fosfato frío. El tejido glómico se incubó durante 20 minutos en una solución enzimática (1 ml de tampón fosfato con 0,6 mg de colagenasa II, 0,3 mg de tripsina, 7,5 microlitros de elastasa porcina (stock: 250 U/mililitro), y 10 microlitros de CaCl<sub>2</sub> de un stock 5 mM) a 37°C. Posteriormente, el tejido glómico se disgregó mediante pinzas finas, se incubó otros 7 minutos a 37°C, y, finalmente, las células se dispersaron pipeteándolas mecánicamente. Se determinó la densidad celular mediante un hemocitómetro (Sigma).

#### 5. *Ensayos de crecimiento in vitro en forma de neuroesferas*

Las células dispersas de cuerpo carotídeo se cultivaron típicamente en placas de 6 pocillos tratadas para la no adherencia (Corning Inc., Corning, NY), a una densidad clonal para favorecer la formación de neuroesferas individualmente identificables. Para los experimentos de crecimiento clonal e individualizado se utilizaron placas tratadas para la no adherencia pero de 96 pocillos en lugar de 6. El medio de cultivo contenía: D-MEM:F-12 (Gibco BRL, Grand Island, NY), 15% de extracto de embrión de pollo (preparado como se describe en Stemple y Anderson, 1992; Cell 71, 973-985), 1% de suplemento de N<sub>2</sub> (Gibco), 2% de suplemento B27 (Gibco), 1% de penicilina/estreptomina (Cambrex, Verviers, Bélgica), 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis, MN), 20 ng/ml de factor de crecimiento de tipo insulina tipo I (IGF-I) recombinante humano (R&D Systems), y 20 ng/ml de que contenían factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de tipo insulina tipo I (IGF-I) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) recombinante humano (R&D Systems). Esta composición de medio se denomina a lo largo de este trabajo como medio de cultivo de cresta neural (medio CN). Todos los cultivos se mantuvieron en incubadores (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) con ambiente controlado de CO<sub>2</sub>, un nivel de oxígeno fijo del 3% y a 37°C.

Para ensayar la capacidad de auto-renovación de las células madre del cuerpo carotídeo, se utilizaron neuroesferas primarias individuales, se re-sembraron sobre sustrato adherente tratado con poli-L-lisina, y se incubaron durante 48 horas con medio CN. Posteriormente se despegaron con tripsina y se dispersaron mecánicamente para terminar cultivando las células de vuelta en placas no adherentes con medio CN. Las neuroesferas secundarias se contaron tras 10 días de cultivo.

Para la identificación inmunocitoquímica de las distintas células dentro de las neuroesferas, éstas se fijaron en 4% de PFA y se les aplicó el mismo protocolo para conseguir rodajas finas que a los cuerpos carotídeos completos (crioprotección, inclusión, y corte fino de 10 micras).

En otras ocasiones las neuroesferas se re-sembraron a placas tratadas para la adherencia, se incubaron durante 10 días con medio CN, y una vez las colonias se habían expandido, se fijaron con 4% de PFA. Posteriormente se aplicó un típico protocolo de inmunocitoquímica: prebloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, incubación con el anticuerpo primario durante 1 hora, y con el anticuerpo secundario durante otra hora, y finalmente contratinción con DAPI, que tiñe los núcleos celulares de azul. La solución bloqueante fue la misma que la utilizada para los tejidos (véase más arriba). Los anticuerpos utilizados en las muestras en condiciones de adherencia fueron: anticuerpo anti-TH hecho en ratón (1:500, Sigma), seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra y conjugado a rodamina (1:100, Chemicon International, Temecula, CA), y anticuerpo anti-actina de músculo liso (SMA, Sigma), seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en burro y conjugado a Cy2 (1:200, Jackson Immunoresearch). Los anticuerpos utilizados sobre secciones finas de neuroesferas fueron: anticuerpo anti-TH de ratón hecho en conejo (el mismo que para los tejidos, véase más arriba) y anticuerpo anti-nestina de rata hecho en ratón (1:200, Chemicon International) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en burro y conjugado a Cy2 (1:200, Jackson Immunoresearch). Las células nestina positiva se observaban de color verde.

#### 6. *Citometría de flujo*

Todos los análisis y separaciones celulares mediante citometría se llevaron a cabo en un citómetro de flujo de tres láseres modelo MoFlo (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO). Las células dispersas de cuerpo carotídeo se resuspendieron en solución de tinción y se incubaron con los distintos anticuerpos durante 20 minutos cada uno a 4°C. La solución de tinción contenía (para 50 ml): 44 ml de medio L15 (Gibco), 0,5 ml de penicilina/estreptomina (Cambrex), 0,5 ml de tampón HEPES 1 M (Gibco), 0,1 g de BSA (Sigma), y 5 ml de agua destilada y desionizada. Los anticuerpos utilizados para citometría de flujo fueron los siguientes: anticuerpo anti-p75 de ratón hecho en conejo (1:2000, Chemicon International) seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra y conjugado a fluoresceína-5-isotiocianato [FITC] (1:200, Jackson Immunoresearch), y anti-FINK-1 de ratón (1:600, Pharmingen/BD Biosciences, San Jose, CA) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra y conjugado a ficoeritrina



[PE] (1:200, Jackson Immunoresearch). Una vez lavados los anticuerpos sobrantes no adheridos, las células se resuspendieron en medio de tinción con 2 mg/ml de 7-amino-actinomicina D [7-AAD] (Molecular Probes, Eugene, OR). Las células muertas se eliminaron en el citómetro por su fenotipo 7-AAD positivas.

#### 5 7. Registro amperométrico de la secreción celular

Algunas neuroesferas crecidas a partir del cuerpo carotídeo se replaquearon sobre cubres tratados con poli-L-lisina, y se incubaron en medio de cultivo normal durante toda la noche. Los cubres con las neuroesferas adheridas se transfirieron a una cámara de registro y se perfundieron de forma continua con una solución que contenía NaCl 117 mM, KCl 4,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 23 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, glucosa 5 mM y sacarosa 5 mM. La solución "hipoglucémica" tenía sacarosa 5 mM en lugar de la glucosa, es decir, un total de sacarosa 10 mM, para prevenir cambios en la osmolalidad. La solución "normóxica" se burbujeó con una mezcla gaseosa con 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub>, y 75% de N<sub>2</sub> (tensión de O<sub>2</sub> 145 mmHg). La solución "hipóxica" se burbujeó con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de N<sub>2</sub> para alcanzar una tensión de O<sub>2</sub> en la cámara de aproximadamente 15 mmHg. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura aproximada en la cámara de unos 36°C. La tasa de secreción, en femtoculombios (fC)/minuto, se calculó como la cantidad de carga transferida al electrodo de registro durante un tiempo determinado (Pardal y López-Barneo, 2002; Nat Neurosci 5, 197-198).

#### 20 8. Registro mediante la técnica de "patch clamp"

Las corrientes macroscópicas voltaje-dependientes de células glómicas en los glomérulos de las neuroesferas se registraron utilizando la configuración "célula completa" de la técnica de "patch clamp", tal y como se adaptó previamente en el laboratorio de los inventores (López-Barneo *et al.*, 1988; Science 241, 580-582). Para el registro de las corrientes macroscópicas de potasio, la composición de las soluciones de registro fue: interna: 80 glutamato potásico 80 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Hepes 10 mM, MgATP 4 mM, ácido etilenglicoltetra-acético [EGTA] 0,1 mM (pH, 7,2); y externa: NaCl 117 mM, KCl 4,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 23 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, glucosa 5 mM y sacarosa 5 mM (pH ajustado con burbujeo de 5% de CO<sub>2</sub>). El potencial fijado en reposo fue de -80 mV. Para los experimentos de registro de corrientes macroscópicas de calcio la composición de las soluciones fue: interna: CsCl 100 mM, CsF 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Hepes 10 mM, MgATP 4 mM, EGTA 0,5 mM (pH, 7,2); y externa: BaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Hepes 10 mM y glucosa 5 mM (pH, 7,4). El potencial fijado de reposo fue de -80 mV.

#### 35 9. Análisis estadístico

Los datos estadísticos se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar, con el número de repeticiones del experimento entre paréntesis. Se estimó la significancia estadística mediante un test pareado de T de Student.

#### 40 Ejemplo 1

##### Inducción del crecimiento del cuerpo carotídeo por hipoxia y generación de nuevas células glómicas derivadas de la cresta neural

La exposición de ratones silvestres C57BL/6 a hipoxia (10% de O<sub>2</sub>) en una atmósfera isobárica durante 3 semanas indujo un incremento del tamaño del cuerpo carotídeo de aproximadamente 2 a 3 veces respecto al tamaño inicial, debido a la dilatación y multiplicación de vasos sanguíneos, así como a la expansión del parénquima, con un incremento en el número de células glómicas TH+ (positivas para la tirosina hidroxilasa) (Fig. 1A).

Para analizar la proliferación y formación de nuevas células glómicas, los ratones C57BL/6 fueron tratados con BrdU y, subsiguientemente, mantenidos varios días en un ambiente normóxico (21% de O<sub>2</sub>) o hipóxico (10% de O<sub>2</sub>). En los animales normóxicos no se observó ninguna célula TH+ y BrdU+, indicando la ausencia de proliferación (Fig. 1 B, izquierda). Por contra, después de unos días en hipoxia, incluso antes de que el crecimiento del CC fuera evidente, se observaron numerosas células TH+ y BrdU+ (flechas en Fig. 1B derecha), indicando la aparición de nuevas células glómicas. El curso temporal de los cambios producidos en el CC en respuesta a hipoxia se muestra en la Figura 1C. Paralelamente a la hipertrofia del CC también se produjo un incremento de 2 a 3 veces del número de células glómicas TH+ formadas *de novo* durante el tratamiento bajo condiciones de hipoxia.

Este análisis cuantitativo también reveló que mientras la incorporación de BrdU en el tejido del CC se observaba desde el día 1 después de la aplicación de las condiciones de hipoxia, las células glómicas nuevas (BrdU+, TH+) sólo empiezan a aparecer después de 5 ó 6 días en hipoxia. Estos datos sugerían la existencia de un proceso de proliferación y diferenciación previo a la aparición de las nuevas células neuronales. Además, cuando los ratones tratados con hipoxia de forma crónica fueron re-introducidos en un ambiente normóxico (re-normoxia) la recuperación del tamaño normal del CC corrió paralela a un descenso en el número de células glómicas. Así, en el CC re-normóxico aproximadamente el 50% de las células glómicas eran BrdU+ (Fig. 1D-F, flechas). Estos datos indican de nuevo la existencia de células precursoras o progenitoras (BrdU+, TH-), cuya proliferación (incorporación de BrdU) en hipoxia precede a su diferenciación hacia células glómicas (TH+). Además, se observó que la modificación estructural inducida por la hipoxia era similar tanto en ratones jóvenes (4-6 semanas, Fig. 1C) como en ratones más viejos (más de 8 meses; células TH+: 1555 $\pm$ 25, n=4 en normoxia y 2470 $\pm$ 358, n=3 en hipoxia).

El origen neural de las células precursoras que dan lugar a las células glómicas fue testado mediante análisis del linaje celular, empleando el ratón transgénico Wnt1-Cre/LacZ floxeado, en el cual las células derivadas de la cresta neural están marcadas (Chai *et al.* 2000 Development 127, 1671-1679; Jiang *et al.*, 2000 Development 127, 1607-1616) (Fig. 2A). El CC en estos animales contiene gran cantidad de depósitos de X-gal que co-localizan con células TH+.

5 Los precipitados de X-gal fueron también observados en células BrdU+, TH+ (Fig. 2B-C). Estos datos demuestran que tanto las células glómicas pre-existentes como las de nueva formación en animales sometidos a hipoxia provienen de la cresta neural.

## 10 Ejemplo 2

### *Identificación de células madre auto-renovables y multipotentes del cuerpo carotídeo*

Para la identificación de los precursores que dan lugar a las células glómicas en roedores adultos expuestos a hipoxia, los cuerpos carotídeos de ratas Wistar jóvenes (>P20) fueron enzimáticamente dispersados y las células sembradas en medios de cultivo para cresta neural (CN) que contenían bFGF, IGF-I y EGF (Morrison *et al.*, 1999, Cell 96, 737-749). Utilizando placas de cultivo tratadas para la no adhesión se induce el crecimiento en condiciones de flotación y así se obtienen neuroesferas. Se estimuló la proliferación clonogénica mediante el cultivo de células en hipoxia moderada (3% de O<sub>2</sub>) (Morrison *et al.*, 2000., J Neurosci 20, 7370-7376), una condición que mimetiza la estimulación por hipoxia del crecimiento del CC *in vivo*.

15 20

En estos experimentos, el 1,04±0,4% (n=6 preparaciones) de las células sembradas dieron lugar a neuroesferas (Fig. 3A). Después de 10 días en cultivo el diámetro de las neuroesferas era de 85±34 micrometros (n=112), un valor comparable con lo descrito para neuroesferas obtenidas a partir de otras poblaciones progenitoras neurales (Molofsky *et al.* 2003; Nature 425, 962-967). El crecimiento de las neuroesferas requiere la presencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo para CN (medio CN) y, por otro lado, el tamaño de las neuroesferas obtenidas es claramente menor si el cultivo se hace en condiciones de normoxia (21% de O<sub>2</sub>). Además, también se observa que la eficiencia en la formación de neuroesferas decrece hasta 0,17±0,02% (n=3 preparaciones) en animales viejos.

25 30

Por contra, en relación con la típica forma esférica de las neuroesferas derivadas del sistema nervioso central (SNC) y otras áreas del sistema nervioso periférico (SNP) (Doetsch *et al.*, 1999, Cell 97, 703-716; Molofsky *et al.*, 2003, Nature 425, 962-967) la mayoría (>85% a los diez días de cultivo) de las neuroesferas derivadas del CC tenían característicamente una o dos protrusiones (flechas en Fig. 3A). El análisis inmunocitoquímico de secciones finas de neuroesferas reveló la presencia de nestina (nestina+) (típico marcador de células progenitoras neurales) en el núcleo central, y agregados de células TH+ y nestina- diferenciadas en las protrusiones glomerulares que se unen al núcleo central a través de un estrecho filamento de tejido (Fig. 3B), y que recuerdan en su forma a los glomérulos característicos del CC *in situ*. Después de varias semanas en cultivo, estos glomérulos crecieron hasta alcanzar el tamaño de un CC adulto (Fig. 3C).

35 40

El origen clonal de las neuroesferas fue confirmado mediante experimentos de siembra individual de células, empleando placas de adherencia ultrabaja de 96 pocillos. Después de 10 días en cultivo, numerosos pocillos que recibieron una única célula, comprobado dos veces en el microscopio, tenían una única neuroesfera con glomérulos, indicando que estas neuroesferas procedían de la proliferación de una sola célula procedente del CC. La eficiencia en la formación de neuroesferas estimada fue de 11,6 ±1,5% (experimentos n=4), significativamente superior a los valores obtenidos en los experimentos de cultivo del total de células. Esta diferencia puede ser debida simplemente a una menor supervivencia de las células en cultivo en los experimentos de siembra del total de células, debido a la presencia de células muertas y restos celulares. En cualquier caso, la frecuencia estimada en la formación de neuroesferas sugiere que debe haber del orden de 200 a 300 células madre en un CC normal de rata.

45 50

Por otro lado, también se ensayó la capacidad de auto-renovación de las células progenitoras del CC mediante la disociación de las neuroesferas primarias y la re-siembra, en placas no adherentes con medio CN, de las células dispersadas en cultivo en las mismas condiciones. El número de neuroesferas secundarias obtenidas (7±2 por neuroesfera primaria, n=10) fue bastante menor que los valores descritos en la literatura en relación a otras poblaciones de progenitores neurales (Molofsky *et al.*, 2003 Nature 425, 962-967). Sin embargo, las dificultades sufridas durante el proceso de disociación de las neuroesferas del CC, que requieren un tratamiento enzimático fuerte y un vigoroso proceso de disrupción, sugiere que las células pueden haber sufrido daños y, consecuentemente, su crecimiento secundario se vea alterado. En este sentido, no es posible descartar una mayor capacidad de auto-renovación de las células progenitoras del CC si los ensayos fuesen realizados en unas condiciones más óptimas.

55 60

La presencia de células TH-, nestina- en el núcleo central de las neuroesferas grandes (Fig. 3B y 3C) sugiere que, además de las células glómicas, las células progenitoras del CC pueden diferenciarse en otros tipos celulares. Esto fue comprobado por inmunocitoquímica en neuroesferas re-sembradas en cultivo en un sustrato adherente. Las células madre del CC fueron capaces de diferenciarse hacia células SMA+ (antígeno específico de actina de músculo liso), un tipo celular típicamente derivado de cresta neural en cultivo (Fig. 3D y 3E) (Kruger *et al.*, 2002, Neuron 35, 657-669). En las neuroesferas no aparece tinción GFAP+ ya que como se mostró en los experimentos *in vivo* (véase el Ejemplo 3), las células pierden este marcador en el momento en que inician el proceso proliferativo. Así, los progenitores del CC se comportan de forma similar a otras células madre derivadas de la cresta neural (Bixby *et al.*, 2002, Neuron 35, 643-656), siendo capaces de producir colonias clonogénicas y auto-renovarse y diferenciarse en múltiples tipos celulares.

65

## Ejemplo 3

*Las células sustentaculares de tipo filial son las células madre del CC*

5 Hasta la fecha siempre se ha pensado que bajo determinadas circunstancias las células glómicas eran capaces de entrar en ciclo mitótico (Nurse and Vollmer, 1997 Dev Biol 184, 197-206; Wang and Bisgard, 2002 Microsc Res Tech 59, 168-177). Por otro lado, está bien establecido que las células glómicas TH+ después de la disociación pueden ser mantenidas en cultivo durante varios días (Lopez-Barneo *et al.*, 1988 Science 241, 580-582; Villadiego *et al.*, 2005 J Neurosci 25, 4091-4098). Para comprobar si la proliferación de las células glómicas daba lugar a las neuroesferas de CC, se llevó a cabo un análisis inmunocitoquímico en diferentes estadios de la formación de neuroesferas (Fig. 4A). Inicialmente, las neuroesferas tenían tamaño pequeño y estaban formadas por grupos de células TH-, nestina+ y otras nestina-. Este estadio es rápidamente seguido de la aparición de pequeños núcleos (protrusiones) germinales con algunas células TH+ en la periferia de las neuroesferas en crecimiento. El número de células TH+ incrementa progresivamente hasta que forman el característico agregado de células glómicas descrito anteriormente. Este desarrollo secuencial sugiere que después de la disociación y el sembrado, las células progenitoras (distintas de las células glómicas maduras) proliferan y se renuevan para formar el núcleo central de las neuroesferas, el cual precede a la diferenciación de los progenitores hacia células glómicas maduras (TH+).

20 La separación por citometría de flujo sugirió que las células TH+ no inician la formación de neuroesferas, ya que las células que expresan mucho HNK-1, un marcador de precursores neuronales derivados de la cresta neural (ventana #1 en Fig. 4B) (Young *et al.*, 1998, Young *et al.*, 1998 Dev Biol 202, 67-84), nunca producen neuroesferas. Tal y como se muestra en la Fig. 4C las poblaciones enriquecidas gracias al marcador HNK-1 eran todas células glómicas TH+.

25 Por otro lado, la separación de una fracción de células que expresaba fuertemente p75, un marcador típico de otras poblaciones de células madre de la cresta neural (Morrison *et al.*, 1999, Cell 96, 737-749) (ventana #2 en Fig. 4B), no incrementaba la producción de neuroesferas. Otros análisis con marcadores de células madre (c-ret, CD133, integrina alfa-4 y SSEA-1) también resultaron fallidos para enriquecer por citometría de flujo las poblaciones de progenitores de CC. Una pista sobre la identidad de las células madre vino de los experimentos realizados *in vivo* que mostraron que mientras que en los CC de animales normóxicos las células tipo II eran claramente identificadas con el marcador GFAP (GFAP+), dicho marcador progresivamente desaparecía con la exposición a hipoxia, a la vez que el número de células BrdU+ o proliferativas aumentaba (Fig. 4D). Además, al llevar a las células tipo II a un ambiente hipóxico también se produce la aparición del marcador de proliferación nestina, que desaparece al volver a ambientes normóxicos (Fig. 9 A-D). Las células GFAP+ reaparecían una vez el animal hipóxico se devolvía a una atmósfera normóxica y el CC volvía a su tamaño original. Estos datos sugerían que las células tipo II estaban sufriendo un proceso de activación en respuesta a hipoxia y, por tanto, podrían ser las células madre del CC.

Una evidencia directa de la identidad de las células madre del CC fue obtenida mediante experimentos *in vivo* de mapeo del linaje celular, empleando un ratón transgénico GFAP-Cre/LacZ floxeado (Fig. 5A). En estos modelos animales el promotor transgénico de GFAP es bastante activo en el cerebro, donde muchas células (gliales y neuronas) se originan de progenitores GFAP+ y, consecuentemente, todas aparecen marcadas como B-gal+ (Malatesta *et al.*, 2003, Neuron 37, 751-764). Por contra, la actividad del promotor transgénico de GFAP era bastante baja en normoxia en el CC y, además, no se detectaron células B-gal+ en los CC de animales que nunca habían sido sometidos a condiciones de hipoxia. Para la activación del promotor transgénico de GFAP, se sometieron los animales a ciclos de hipoxia/renormoxia causando desaparición y reaparición de la expresión de GFAP en las células sustentaculares y la activación de la construcción transgénica. En estos animales, una segunda exposición a hipoxia produjo el crecimiento del CC y la deposición selectiva de X-gal en las células glómicas nuevas (TH+ y BrdU+). Esto demuestra que éstas derivan de progenitores GFAP+. La localización de los depósitos de X-gal sobre las células BrdU+, TH+ fue confirmada mediante dispersión de células y tinción de células aisladas.

50 En la Figura 9 se puede observar que las células GFAP+ tipo II del CC que presentan depósitos de X-gal son las células madre, ya que dan lugar a un crecimiento en forma de neuroesferas (células glómicas TH+).

## Ejemplo 4

55

*Las células glómicas generadas in vitro tienen características quimiorreceptoras, electrofisiológicas y neuroquímicas maduras*

60 Las células glómicas son fisiológicamente muy complejas, ya que son eléctricamente excitables y son capaces de detectar diferentes variables físico-químicas en sangre. Cuando son activadas por la disminución de las concentraciones de O<sub>2</sub> o de glucosa extracelular, las células glómicas del CC exhiben un repentino aumento de la liberación de catecolaminas, que puede ser monitorizado por amperometría (Pardal *et al.*, 2000 Proc Natl Acad Sci U S A 97, 2361-2366, Pardal y López-Barneo, 2002 Nat Neurosci 5, 197-198). Estas mismas respuestas a hipoxia e hipoglucemia fueron detectadas en células glómicas obtenidas *in vitro* a partir de células madre o progenitoras de la invención (Fig. 6 A-C).

65 Las células glómicas de los glomérulos generados *in vitro* fueron sometidas a la técnica de "patch clamp". La Figura 6D muestra cómo las células glómicas nuevas muestran corrientes de entrada seguidas de amplias corrientes

de salida (Fig. 6E). Tal y como sucede con las células glómicas normales, el bloqueo de las corrientes de salida con Cs<sup>+</sup> revela la presencia de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Fig. 6F). Estos datos indican que las células TH+ derivadas *in vitro* a partir de progenitores del CC tienen las mismas características funcionales que las células glómicas maduras.

5

Por otro lado, además de ser altamente dopaminérgicas, las células glómicas del CC son capaces de producir grandes cantidades de GDNF, un potente factor neurotrófico que promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. En los ratones heterocigotos knock out GDNF/LacZ la producción de GDNF está marcada (Sánchez *et al.*, 1996 Nature 382, 70-73) por la aparición de depósitos de X-gal que aparecen selectivamente concentrados en la células glómicas. Empleando esta misma herramienta los experimentos mostraron que la exposición de los mencionados ratones a hipoxia daba lugar a depósitos de X-gal sobre células TH+, BrdU+ (Fig. 7A-D). Estos datos indican que las células glómicas formadas *de novo* también adquieren la capacidad de sintetizar GDNF.

10

## 15 Ejemplo 5

### *Aplicabilidad de la terapia celular en la enfermedad de Parkinson*

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

20

Para cada rata parkinsoniana se implantaron unas 20 neuroesferas de cuerpo carotídeo en el estriado desnervado (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 microlitro de 6-OHDA (4 mg/ml; coordenadas AP=-5,3; L=-2,3; V=-8,2). Las neuroesferas de cuerpo carotídeo se obtuvieron tras la dispersión y disociación del cuerpo carotídeo mediante incubación durante 20 minutos en solución fisiológica sin calcio ni magnesio pero con colagenasa (0,6 mg/ml) y tripsina (0,3 mg/ml). Las células dispersas se sembraron en placas no adherentes con medio de cultivo que contenía factores tróficos específicos de células madre derivadas de la cresta neural. Cada neuroesfera obtenida por este método contenía entre 50 y 100 células glómicas o tipo I perfectamente diferenciadas.

30

A los diez, treinta y noventa días tras el trasplante de las neuroesferas, 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 de los niveles de dopamina intraestriatales en rodajas de tejido cerebral. Los estudios morfológicos fueron de carácter inmunocitoquímico, empleando tinciones mediante anticuerpos frente a tirosina hidroxilasa (TH), que indicaban la presencia o ausencia 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.

40

Los resultados funcionales fueron muy positivos: los registros amperométricos, que detectaron una caída superior al 90% de dopamina en el estriado desnervado sin trasplante, revelaron una recuperación hasta del 65% de los niveles de dopamina en el estriado con trasplante de tres meses de evolución. Los estudios morfológicos mostraron la presencia de trasplantes con células glómicas positivas a la tirosina hidroxilasa, asociadas en glomérulos y que expresaban también factores tróficos del tipo del GDNF (Fig. 7). 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, y b) los reflejos sensoriomotores se recuperaron al cabo de tres meses.

45

50

### *Conclusiones*

Aunque se sabía que la neurogénesis era mantenida en nichos específicos del cerebro de los mamíferos adultos, se desconocía la existencia de centros germinales en el SNP. Ahora, los inventores han descubierto, sorprendentemente, la presencia de células madre en el CC de ratones adultos. Los estudios realizados han demostrado que la producción *de novo* de células glómicas neuronales depende de una población de células madre presentes en el CC, las cuales forman colonias multipotentes y auto-renovables *in vitro*. Los análisis del linaje celular *in vivo* indican que, inesperadamente, las células madre del CC son las células sustentaculares o tipo II con fenotipo glial.

55

60

Los auto-trasplantes realizados hasta la fecha con agregados celulares del cuerpo carotídeo han aliviado los síntomas de pacientes de Parkinson (Arjona *et al.*, 2003), pero se ha observado que existen factores limitantes de esa terapia que radican en la integridad histológica del CC en edades avanzadas, así como en la escasa cantidad de tejido de la que se dispone para los trasplantes. Los experimentos llevados a cabo por los inventores muestran cómo, después de 10 días en cultivo, las células madre y/o las células progenitoras del CC de roedores adultos, tratadas con el método de expansión de la invención, son capaces de producir células glómicas con una gran eficiencia.

65

## ES 2 326 108 B1

Por otro lado, el cultivo durante más de tres semanas de agregados de células glómicas en una única neuroesfera es capaz de alcanzar el tamaño de un CC completo pudiendo de este modo obtener una gran cantidad de biomasa celular para su empleo en los tratamientos terapéuticos. Además, estas nuevas células tienen las mismas propiedades quimiosensoras y electrofisiológicas que las células glómicas adultas *in situ* (Fig. 6), son altamente catecolaminérgicas, sintetizan factores tróficos como el GDNF (Fig. 7) y han arrojado resultados muy positivos en terapia celular frente al Parkinson.

De hecho, los ensayos realizados han permitido establecer que:

- 10 a) el CC es un centro germinal del SNP, donde la neurogénesis de células neuronales adultas ocurre *in vivo*, tal y como sucede en el SNC de mamíferos, donde los tejidos neurales adultos retienen progenitores que producen nuevas neuronas durante la vida del animal;
- 15 b) los centros germinales del CC tienen un destacado poder de regeneración *in vivo*, con un importante papel fisiológico durante la adaptación a la hipoxia crónica;
- c) el CC contiene células madre multipotentes y con capacidad auto-regenerativa (células tipo II), y capacidad para diferenciarse, *in vivo* e *in vitro*, hacia células tipo I o glómicas; y
- 20 d) los trasplantes de las células obtenidas por el método de expansión de la invención son capaces de revertir los cuadros clínicos de enfermedades neurodegenerativas.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula madre adulta aislada, procedente del cuerpo carotídeo, **caracterizada** porque es positiva para el marcador fenotípico GFAP (proteína ácida fibrilar de origen glial) y negativa para los marcadores fenotípicos TH (tirosina hidroxilasa) y nestina.
2. Una célula progenitora adulta, aislada, derivada de dicha célula madre según la reivindicación 1, **caracterizada** porque es positiva para el marcador fenotípico nestina.
- 10 3. Célula progenitora según la reivindicación 2, **caracterizada** porque es débilmente positiva para el marcador GFAP y positiva para el marcador fenotípico nestina.
- 15 4. Célula progenitora según la reivindicación 2, **caracterizada** porque es negativa para el marcador GFAP y positiva para el marcador fenotípico nestina.
5. Una célula diferenciada, adulta, derivada de dicha célula madre según la reivindicación 1 o de dicha célula progenitora según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada** porque es negativa para el marcador fenotípico nestina y es positiva para un marcador de especialización.
- 20 6. Célula diferenciada según la reivindicación 5, en la que dicho marcador de especialización es la tirosina hidroxilasa (TH).
7. Célula diferenciada según la reivindicación 5, en la que dicho marcador de especialización es la actina de músculo liso (SMA).
- 25 8. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque ha sido manipulada genéticamente.
- 30 9. Una célula inmortalizada de forma reversible, **caracterizada** porque dicha célula se selecciona del grupo formado por una célula madre según la reivindicación 1, una célula progenitora según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, y una célula diferenciada según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
10. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, de origen humano.
- 35 11. Una población, aislada, de células derivadas del cuerpo carotídeo que comprende un conjunto de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o combinaciones de las mismas.
12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o combinaciones de las mismas, o de una población celular según la reivindicación 11, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. Uso de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o combinaciones de las mismas, o de una población celular según la reivindicación 11, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en el tratamiento de lesiones isquémicas del sistema nervioso, en el tratamiento de lesiones traumáticas del sistema nervioso, o en el tratamiento de lesiones autoinmunes del sistema nervioso.
- 45 14. Uso según la reivindicación 13, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.
- 50 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que dichas células son células glómicas (nestina-/TH+) *de novo*, derivadas de dicha célula madre según la reivindicación 1 o de dicha célula progenitora según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 55 16. Uso según la reivindicación 15, en el que dichas células glómicas *de novo*, en forma de neuroesferas.
17. Un método para la expansión de células madre según la reivindicación 1 o de células progenitoras según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende cultivar dichas células madre o progenitoras bajo condiciones de hipoxia en un medio de cultivo específico para la cresta neural.
- 60 18. Método según la reivindicación 17, en el que dichas células madre o progenitoras son cultivadas en una superficie no adherente.
19. Método según la reivindicación 17, en el que dicho medio de cultivo específico para la cresta neural comprende un medio de cultivo, una fuente de nutrientes, antibióticos y un factor de crecimiento.
- 65 20. Método según la reivindicación 19, en el que dicho factor de crecimiento se selecciona entre un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o una variante funcional del mismo, un factor de crecimiento de tipo insulina tipo I

## ES 2 326 108 B1

(IGF-I) o una variante funcional del mismo, un factor de crecimiento epidérmico (EGF) o una variante del mismo, y una combinación de dichos factores.

5 21. Método según la reivindicación 17, en el que el cultivo de dichas células madre o progenitoras se lleva a cabo en presencia de una concentración de oxígeno inferior al 15%, preferentemente entre 1-10%, más preferentemente entre 2-5% y aun más preferentemente del 3%.

10 22. Un método para evaluar *in vitro* la respuesta celular a un compuesto potencialmente terapéutico que comprende poner en contacto un cultivo que comprende células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, con un compuesto potencialmente terapéutico y evaluar los efectos causados por dicho compuesto sobre las células presentes en dicho cultivo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

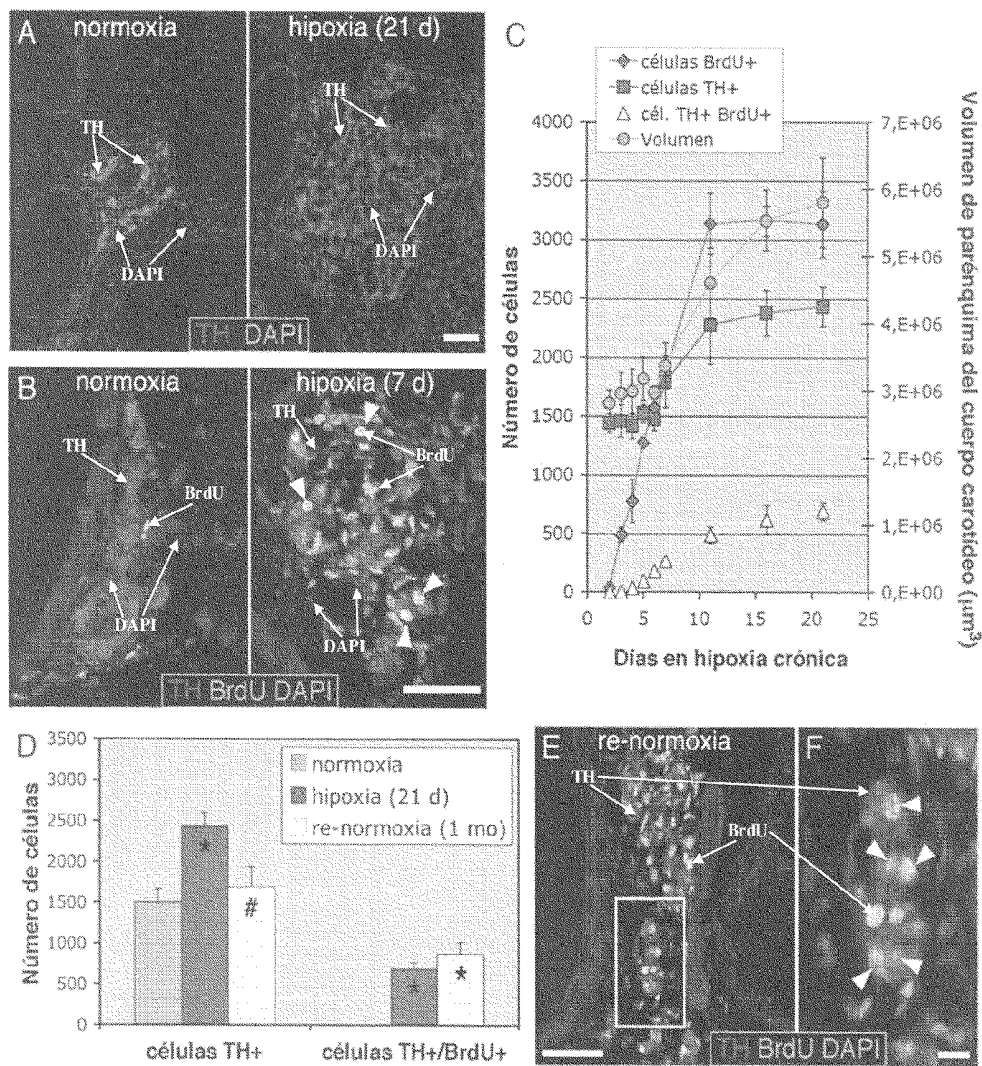




FIG. 2

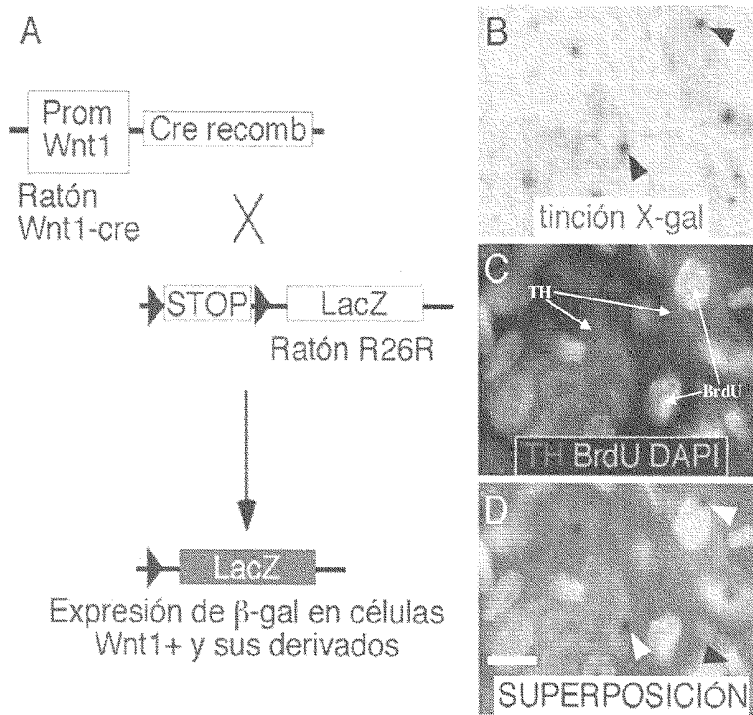


FIG. 3

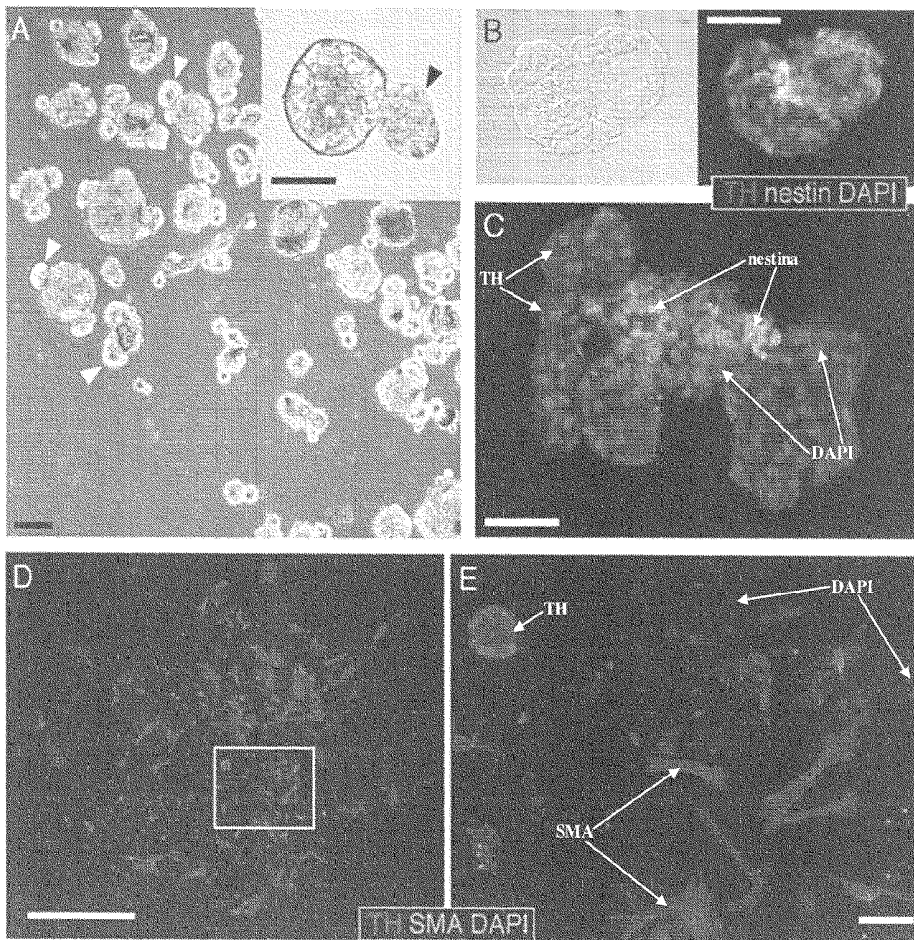


FIG. 4

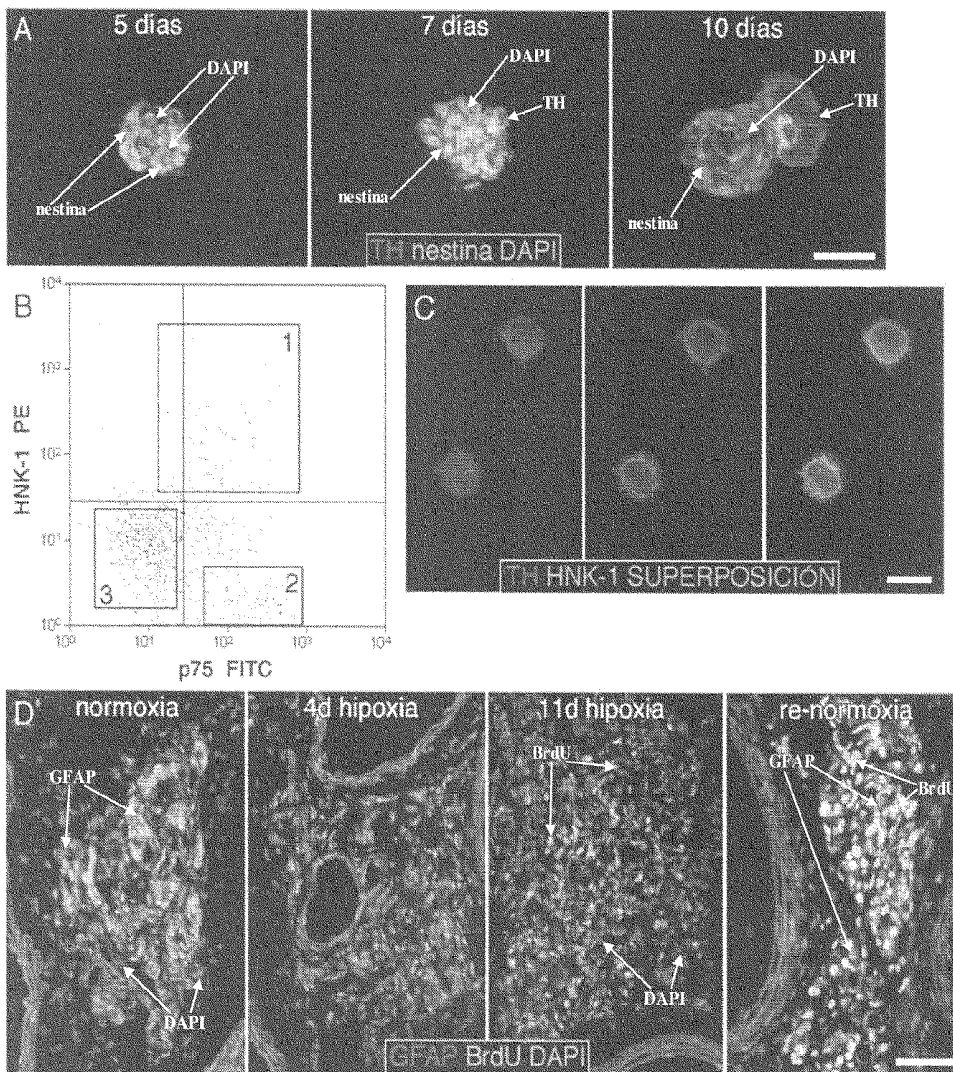


FIG. 5

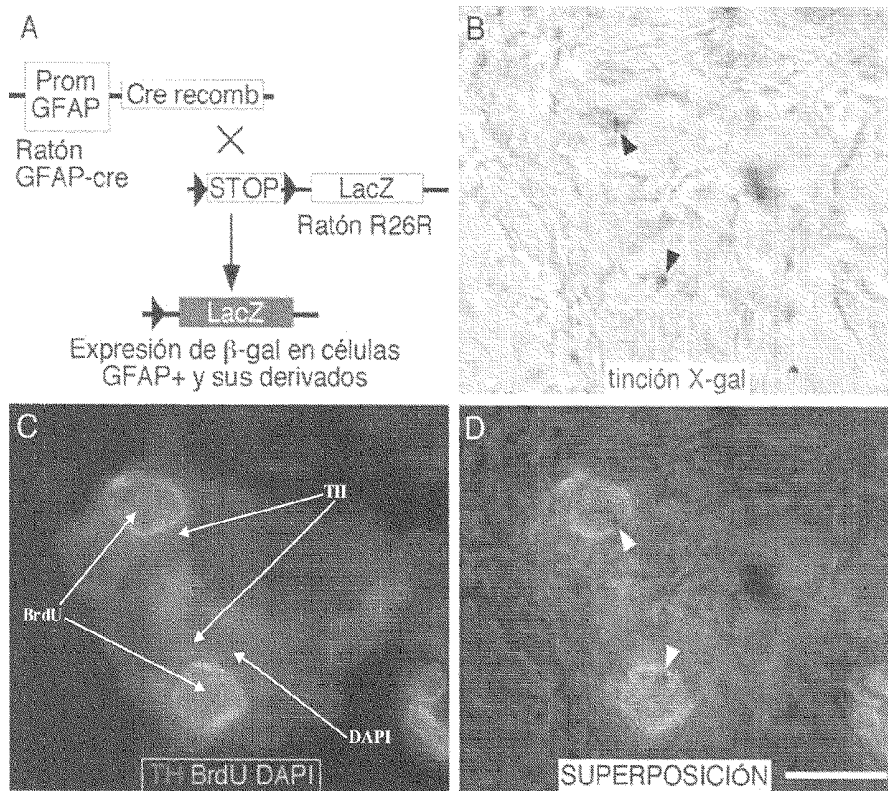


FIG. 6

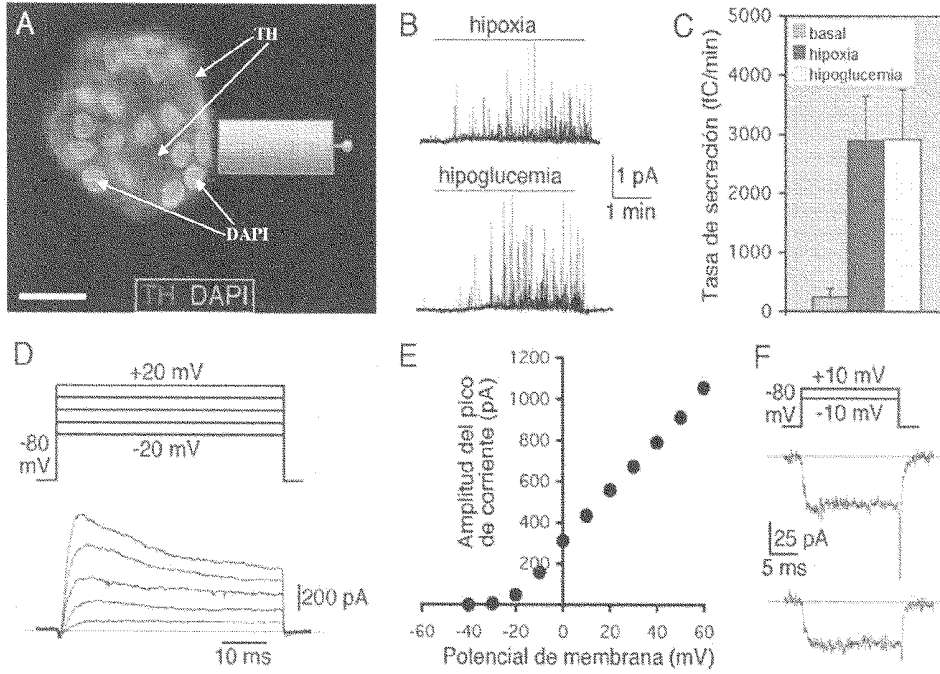


FIG. 7

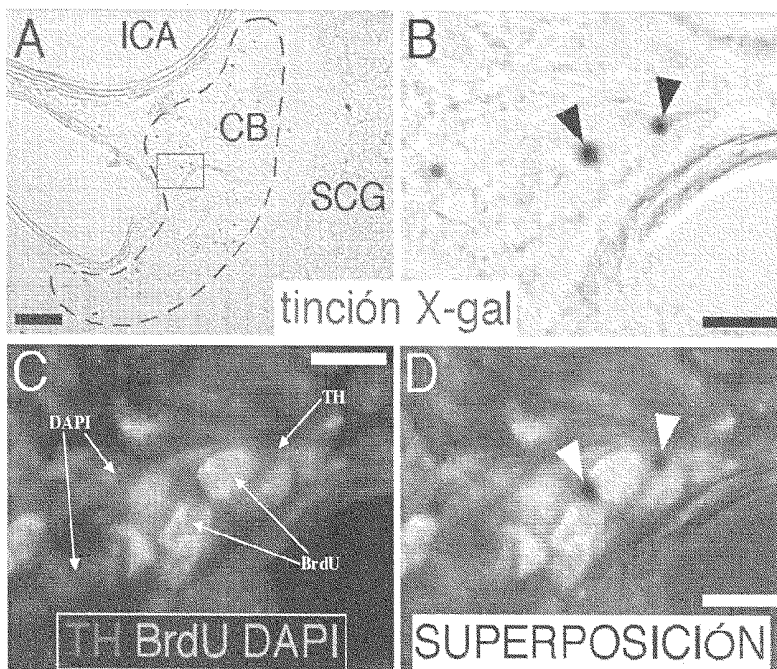


FIG. 8

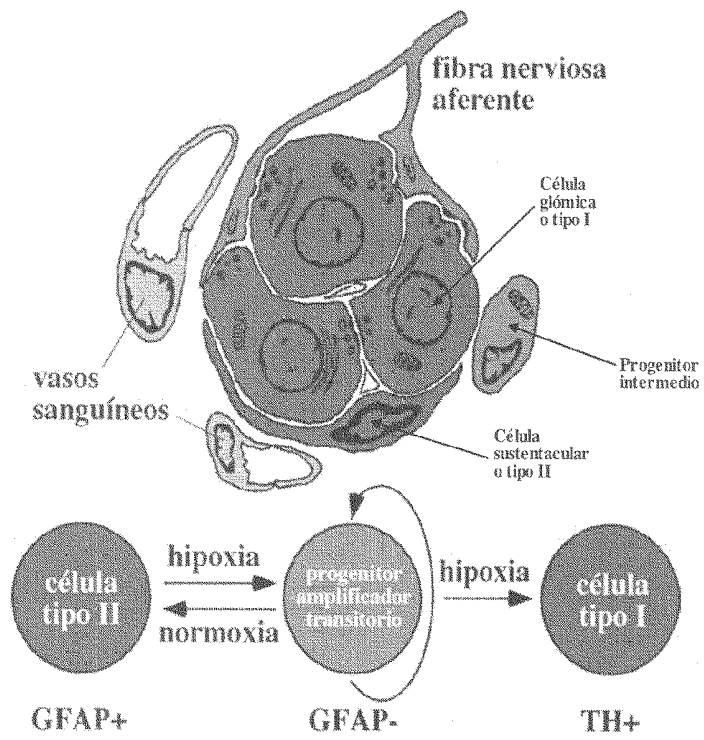


FIG. 9

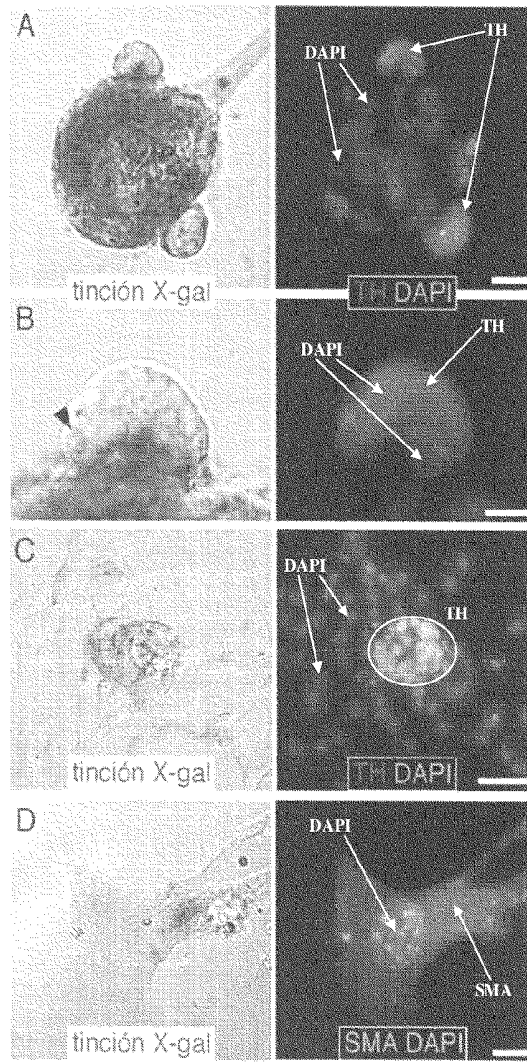
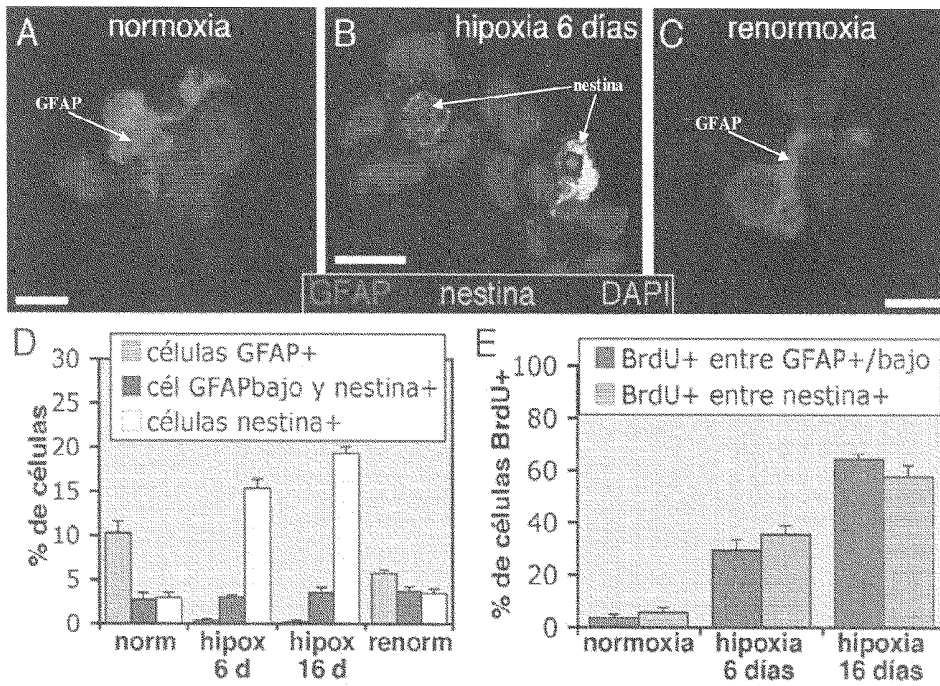


FIG. 10







OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 326 108

② Nº de solicitud: 200702167

② Fecha de presentación de la solicitud: **02.08.2007**

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SAN SEBASTIAN, W., et al. Modification of the number and phenotype of striatal dopaminergic cells by carotid body graft. Brain : a journal of neurology. Mayo-2007 (publicado on line el 17.04.2007). Vol 130, nº 5, páginas 1306-1316. ISSN 1460-2156 (electrónico). Ver todo el documento.	1-22
A	VILLADIEGO, J., et al. Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. The Journal of neuroscience. 20.04.2005. Vol. 25, nº 16, páginas 4091-4098. ISSN 1529-2401 (electrónico). Ver resumen, introducción y discusión.	5,6,10-15
A	HAO G, et al. Intrastratial grafting of glomus cells ameliorates behavioral defects of Parkinsonian rats. Physiology & behaviour Diciembre-2002. Vol. 77, nº 4-5, páginas 519-525. ISSN 0031-93	5,6,9-15 4.
A	TOLEDO-ARAL, J, et al. Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. The Journal of neuroscience 01.01.2003. Vol. 23, nº 1, páginas 141-148. ISSN 1529-2401 (electrónico). Ver resumen, introducción y discusión.	1-22
A	WO 2006128131 A2 (CODMAN & SHURTLEFF, INC.) 30.11.2006, todo el documento.	
A	LINAZASORO, G. Células madre: ¿solución a la problemática actual de los trasplantes en la enfermedad de Parkinson? Neurología. Marzo-2003, Vol. 18, nº 2, páginas 74-100. ISSN 0213-4853. Ver todo el documento, especialmente las páginas 78,82-90,94-96.	

**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**

10.09.2009

**Examinador**

B. Pérez Esteban

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 5/06** (2006.01)

**C12N 5/08** (2006.01)

**A61K 35/30** (2006.01)

**C12R 1/91** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.09.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-22	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-22	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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 ha sido publicada.

**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	SAN SEBASTIAN, W., et al.	Mayo-2007
D02	VILLADIEGO, J., et al.	20.04.2005
D03	HAO G, et al.	Dic-2002
D04	TOLEDO-ARAL, J, et al.	01.01.2003
D05	WO 2006128131 A2	30.11.2006
D06	LINAZASORO, G.	01.03.2003

**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 células madre adultas derivadas del cuerpo carotídeo, positivas para el marcador fenotípico GFAP (proteína ácida fibrilar de origen glial) y negativas para los marcadores tirosina hidroxilasa (TH) y nestina, así como las células progenitoras adultas, células diferenciadas adultas y células inmortalizadas de forma reversible que derivan de estas células madre. Reivindica, asimismo, el uso de todos estos tipos celulares para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson), o de diferentes lesiones del sistema nervioso.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el aislamiento y uso de células madre obtenidas del cuerpo carotídeo. Por tanto, se considera que la solicitud constituye la primera divulgación de la existencia de células madre obtenidas del cuerpo carotídeo, que, por consiguiente, serían nuevas e inventivas, así como las células derivadas de las mismas, y el uso de las diferentes células. Es decir, la invención cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986, de Patentes.

Los documentos citados en este informe como D01 a D04 se refieren a diferentes estudios acerca del efecto de trasplantes de células del cuerpo carotídeo en el cerebro de animales, y su posible utilidad para el tratamiento del Parkinson. En el documento D05 encontramos distintos implantes celulares como tratamiento del Parkinson, y el documento D06 es una revisión de las posibilidades de las células madre como alternativa a los trasplantes en el tratamiento del Parkinson. En ningún caso se estima que estos documentos anticipen la solicitud de patente objeto de este informe, ni que afecten a su novedad ni a su actividad inventiva.

Así, en el documento D01 se describe que, tras el implante de agregados celulares del cuerpo carotídeo, se aprecia una significativa recuperación de las capacidades motoras en monos en los que había inducido Parkinson, y que esa recuperación se mantiene en el tiempo. Aunque se observa un aumento en células inmunoreactivas para TH, los datos no permiten establecer que la mejoría se deba a la presencia de estas células, al efecto trófico del factor GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), o a otros motivos.

En los documentos D02, D03 y D04 se realizan trabajos muy semejantes al presentado en D01. Se trata de experimentos realizados en ratones y ratas, y en D03 se emplean células glómicas inmortalizadas. En ambos casos, al igual que en D01, se observan mejoras en los parámetros motores cuando se implantan las células del cuerpo carotídeo en el estriado de los animales, y se asocia la mejoría al aumento en los niveles del factor GDNF.

En ninguno de los documentos se menciona la existencia de células madre en el cuerpo carotídeo, por lo que se considera que estos documentos no afectan la novedad de la invención objeto de este informe.

El documento de patente D05 se reivindican implantes de distintos tipos celulares como sistema de tratamiento de pacientes de Parkinson. Entre las células reivindicadas se incluyen células glómicas del cuerpo carotídeo y células madre capaces de diferenciarse en neuronas dopaminérgicas. Dado que las células madre derivadas del cuerpo carotídeo no se incluyen como tal, esta patente no afectaría en modo alguno la novedad de la presente solicitud.

Hoja adicional

En el documento D06 el autor revisa las soluciones al tratamiento del Parkinson, con especial atención a la posible utilidad de las células madre como terapia para esta enfermedad. Aunque dedica un apartado al empleo de las células derivadas del cuerpo carotídeo, no hace referencia a células madre aisladas de este órgano. En el epígrafe correspondiente a las células madre se centra especialmente en células madre del sistema nervioso central y en células madre embrionarias y células madre adultas de médula ósea, y comenta su capacidad de diferenciación en neuronas dopaminérgicas. No se menciona en ningún momento la posibilidad de aislar células madre del cuerpo carotídeo, por lo que, de nuevo, esta publicación no afectaría la novedad de la presente solicitud.