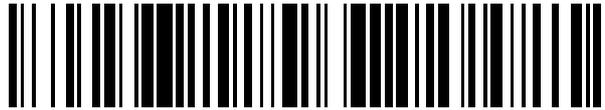


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 765**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004 E 04805929 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1706484**

54 Título: **Células madre de Müller**

30 Prioridad:

03.12.2003 GB 0328021

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

04.08.2014

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF OPHTHALMOLOGY (100.0%)
11-43 BATH STREET
LONDON EC1V 9EL, GB**

72 Inventor/es:

**KHAW, PENG TEE y
LIMB, GLORIA ASTRID**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 482 765 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre de Müller

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la restauración de la función visual mediante el trasplante de células. En particular, la presente invención se refiere al uso de células madre de Müller adultas para el tratamiento de trastornos visuales y trastornos neurológicos.

Antecedentes de la invención

10 La restauración de la función visual es uno de los objetivos fundamentales en la investigación de la visión. Los tratamientos actuales para las enfermedades graves que conducen a ceguera, tal como la degeneración macular relacionada con la edad (DME), el glaucoma, la retinopatía diabética y las complicaciones del desprendimiento de retina, son sólo sintomáticos o frenan la progresión de la enfermedad, pero no restauran la función visual. Las investigaciones recientes que implican el trasplante de las células madre en un amplio espectro de enfermedades han entusiasmado a la comunidad médica y científica, y las investigaciones con células madre para restaurar los circuitos neurales de las retinas enfermas se ven alentadas por los resultados obtenidos con el trasplante de células
15 progenitoras para tratar otras enfermedades humanas, entre ellas leucemia, quemaduras serias de la piel y disfunción del miocardio.

Hasta la fecha, los estudios sobre el trasplante destinados a la restauración de la función de la retina humana han tenido poco éxito, y se han limitado al trasplante de células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y de células del epitelio pigmentario del iris (EPI). El trasplante experimental de EPR, de células de Schwann y de células precursoras procedentes del cerebro en los modelos animales de degeneración retiniana ha proporcionado cierto éxito a la hora de conservar la función de la retina. El trasplante retiniano de células precursoras procedentes del cerebro a ratas RCS (un modelo de degeneración retiniana) favorece la supervivencia de las células fotorreceptoras. Sin embargo, aunque las células trasplantadas migran a la capa de células fotorreceptoras, no logran expresar los marcadores neurales de la retina, lo que sugiere que se necesita un precursor neuronal específico para la
20 regeneración funcional y morfológica de la retina.

En los primeros estudios se pensaba que las células madre podían aislarse sólo de los embriones, por lo cual las células progenitoras neurales se identificaron primero en el sistema central y en el sistema nervioso periférico (SNC y SNP) de los embriones de mamíferos. Sin embargo, las investigaciones más recientes han identificado células madre adultas en regiones neurógenas del SNC, y esto ha impulsado más estudios en busca de células madre adultas.
30

Limb et al., *IOVS*, 2002; 43 (3); 864-869 describen la identificación de células de Müller inmortalizadas de manera espontánea.

Las células de Müller son neuroglíocitos radiales que atraviesan en vertical todo el espesor de la retina. Estabilizan la compleja arquitectura retiniana, dan soporte metabólico y estructural a las neuronas y a los vasos sanguíneos, impiden la migración aberrante de los fotorreceptores al espacio subretiniano y regulan el transporte de líquidos entre la cavidad vítrea y el espacio subretiniano. Casi todas las afecciones patológicas de la retina que constituyen las causas principales de ceguera, entre ellas la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética proliferativa, la vitreorretinopatía proliferativa (VRP) y la retinitis pigmentaria (RP) están asociadas a cambios en la distribución, proliferación o funcionamiento de las células de Müller.
35

40 En Fischer et al., *Nature Neuroscience*, 2001; 4(3): 247-252 se describe la identificación de los neuroglíocitos de Müller obtenidos de la retina de pollos posnatales. Se demuestra que los neuroglíocitos de Müller no están diferenciados, proliferan y expresan factores de transcripción que se expresan normalmente en las células progenitoras de la retina embrionaria. Los neuroglíocitos de Müller proliferan en respuesta a daños en la retina.

45 En Tropede et al. (*Science* (2000) 287, páginas 2032-2036) se describen los estudios en ratones de 2 a 3 meses de edad y se presenta la identificación de una célula madre en el ojo del ratón.

En Ahmad et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 270, páginas 517-521) se describe la caracterización de las células progenitoras neurales aisladas del ojo de mamífero (rata) adulto.

50 En el ojo humano se ha demostrado que, durante el desarrollo fetal, se encuentran células madre de Müller que dan origen a diferentes células de la retina, pero no hay pruebas todavía de que estas células puedan estar presentes en la retina neural adulta.

En Guidry et al. (*IVOS*, vol. 44, n.º 3, marzo de 2003 (2003-03), páginas 1355-1363) se describe un estudio para

valorar la capacidad que tienen las células de Müller humanas para generar fuerzas de la tracción y para determinar la función que desempeñan los factores de crecimiento y las integrinas de fijación al colágeno en este proceso.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar células adecuadas para ser usadas en los tratamientos de trasplante de células de la retina, para el tratamiento de los daños de la retina humana.

5 Compendio de la invención

La presente invención se basa en la realización de que se pueden obtener células de Müller de la retina neural adulta de los humanos y hacer que se comporten como células madre en las condiciones adecuadas.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, un procedimiento para producir células de la retina, útiles en el tratamiento de trasplante, comprende las etapas de:

- 10 (i) obtener *in vitro* una o varias células de Müller adultas de humano que expresan la proteína de fijación al retinaldehído celular y la vimentina; y
- (ii) cultivar las células en presencia de una proteína de la matriz extracelular seleccionada entre matrigel, fibronectina, colágeno, vitronectina y laminina, y un factor de crecimiento seleccionado entre EGF o FGF-2 para desdiferenciar las células en células que expresan al menos uno de los marcadores de célula progenitora seleccionados entre nestina, proteína *sonic hedgehog*, tubulina β III, Shh, Sox-2 y Chx10, por 15 medio de lo cual las células de Müller se han vuelto inmortales.

La capacidad de tomar células de Müller adultas de mamífero y tratarlas para inducir la desdiferenciación permite obtener gran cantidad de células y utilizarlas para el tratamiento de trasplante. Las células producidas de acuerdo con el procedimiento de la invención se ha demostrado que conservan la integridad de la retina y atenúan la pérdida 20 de la función visual cuando se inyectan en el espacio subretiniano de las ratas RCS.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, las células de la retina que se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento esbozado anteriormente se utilizan para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección asociada a la pérdida de células o al daño de las células.

Descripción de los dibujos

25 La invención se describe en relación con los dibujos acompañantes, en donde:

La figura 1 es una representación fotográfica de las células de Müller, bien (A) en placas de plástico de cultivo de tejidos, (B) en placas de plástico de cultivo de tejidos que muestran microvellosidades características, y (C) que muestran las proyecciones de las placas motoras;

30 La figura 2 es una representación fotográfica de las células de Müller que crecen en diferentes condiciones de cultivo;

La figura 3 es una representación fotográfica de los cultivos de las células de Müller en distintas condiciones; en donde (A) muestra la expresión de la ciclina D y (B) muestra la fijación a la aglutinina de cacahuete;

La figura 4 es una representación fotográfica de la expresión de los marcadores neurales retinianos de las células de Müller cultivadas sobre matrigel en presencia de ácido retinoico;

35 La figura 5 es una representación fotográfica de la expresión de los marcadores neurales retinianos en las células de Müller cultivadas sobre matrigel en presencia de FGF2 y IGF-1;

La figura 6 es una representación fotográfica de las células de Müller trasplantadas en las ratas RCS, y muestra el aspecto de la retina transcurridos 4 meses después del trasplante;

40 La figura 7 es una representación fotográfica de las células de Müller trasplantadas en el espacio subretiniano de una rata RCS, en la que se identifican las células con anticuerpos contra marcadores; y

La figura 8 es una representación gráfica de la respuesta a estímulos visuales de una rata RCS después del trasplante con las células de Müller de la invención.

Descripción de la invención

45 La presente invención permite identificar, expandir y mantener las células progenitoras de Müller adultas de humano, lo que permite el uso de las células para el tratamiento de trasplante con el que tratar distintos trastornos de la retina. Las células de Müller adultas se pueden aislar de una retina de donante mamífero y pueden expresar los marcadores de las células maduras, pero al tratarlas en condiciones específicas *in vitro*, las células vuelven a entrar

en el ciclo celular y se desdiferencian en células que expresan los fenotipos de las células progenitoras, tales como la nestina, la proteína *sonic hedgehog*, los factores de transcripción Sox-2, Pax-6 y Chx10, tubulina β III y se fijan a la aglutinina de cacahuete. También expresan los marcadores de neuronas retinianas diferenciadas, entre ellos HuD, calretinina, calbindina, Brn 5.0, enolasa específica de las neuronas, Thy-1, periferina, rodopsina y proteína de neurofilamentos de 70 kDa.

La terminología «desdiferenciación» la conocen bien los expertos en la técnica y se refiere al cambio de un fenotipo celular desde un estado diferenciado a un fenotipo de célula progenitora.

Las células de Müller adultas de humano se pueden obtener de la retina de un ojo humano adulto con las técnicas descritas en la presente memoria. En las condiciones de cultivo normales, las células de Müller adultas expresarán marcadores de células de Müller maduras, que incluyen la proteína de fijación al retinaldehído celular (CRALBP, por su nombre en inglés), la glutamina sintetasa, la vimentina y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (Lewis et al., *Exp. Eye Res.* 1988; 47: 855-868). Las células de Müller se identifican por su forma característica en la microscopia de contraste de fases y por expresar los marcadores indicados anteriormente (Sarthy et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1998; 39: 212-216). Cuando están en subconfluencia, las células de Müller en cultivo muestran las características morfológicas que se observan típicamente en la retina *in vivo*: son células sin pigmentar de forma alargada, con proyecciones de placas motoras características y superficies con vello (véase la figura 1a, b y c); responden al glutamato a juzgar por su respuesta electrofisiológica, y no expresan la GFAP en condiciones sin estrés.

Para producir las células de Müller desdiferenciadas es necesario que las células de Müller adultas que se aislaron se cultiven en presencia de una proteína de la matriz extracelular y un factor de crecimiento. Las proteínas de la matriz extracelular son proteínas complejas que rodean las células y las mantienen en un órgano. La proteína de la matriz extracelular se selecciona entre matrigel, fibronectina, colágeno, vitronectina y laminina. Las condiciones de cultivo también requieren un factor de crecimiento que ayude a la desdiferenciación. El factor de crecimiento se selecciona entre el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por su nombre en inglés) o el factor 2 de crecimiento del fibroblasto (FGF-2, por su nombre en inglés). El factor de crecimiento preferido es el factor de crecimiento epidérmico (EGF). En la figura 2 se muestra el aspecto de las células de Müller en diferentes condiciones de cultivo.

El cultivo de las células de Müller adultas en estas condiciones permite que se produzca la desdiferenciación, lo que conduce a que las células de Müller expresen nestina, tubulina β III, y que se fijen a la aglutinina de cacahuete, los cuales son marcadores conocidos de las células progenitoras neurales en el embrión. Estos marcadores se pueden identificar con facilidad mediante sistemas de detección convencionales basados en anticuerpos, p. ej., inmunocitoquímica o inmunotransferencia (Limb et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002; 43: 864-869 y Lewis et al., *Am. J. Ophthalmol.*, 1994; 118: 368-376).

Las células desdiferenciadas se pueden utilizar en este estado o se pueden diferenciar en un fenotipo celular concreto mediante el uso de agentes de diferenciación específicos. Por ejemplo, en presencia de ácido retinoico (AR), un agente bien conocido de diferenciación de las células madre, las células de Müller forman un mosaico de células que parecen células ganglionares y que expresan una proteína neurofilamentar de bajo peso molecular, y la enolasa específica de las neuronas, marcadores característicos de las células neurales. Otros agentes de diferenciación adecuados incluyen 3,3',5-triiodo-L-tironina, insulina y TGF β . Se pueden utilizar combinaciones de agentes de diferenciación para formar fenotipos concretos. Por ejemplo, la combinación del FGF2 y el IGF-1 induce a que las células progenitoras de Müller de humano expresen Thy-1, enolasa específica de las neuronas (NSE, por su nombre en inglés) (marcadores de las principales neuronas retinianas, tales como las células ganglionares) y periferina (expresada por los bastones y conos fotorreceptores). De este modo se puede producir un fenotipo específico para el tratamiento de una afección asociada a la pérdida, o al daño, de este tipo concreto de células. Por lo tanto, el procedimiento de la invención permite preparar una gran cantidad de tipos de células específicas y utilizarlas para los tratamientos.

Además, el procedimiento de la invención permite preparar numerosas capas de células de la retina, en donde cada capa tiene un fenotipo diferente. Las células de Müller se pueden preparar para que se diferencien en diferentes neuronas retinianas específicas y se pueden colocar en sustancias de matriz que están estratificadas para producir una estructura retiniana para injerto.

La diferenciación de las células de Müller también puede estar influida por el medio local al introducirlas en un paciente. En las áreas dañadas se producen factores de crecimiento que pueden determinar el fenotipo definitivo de las células de Müller trasplantadas. Por lo tanto, las células de Müller desdiferenciadas pueden administrarse a un paciente y adoptar el fenotipo de las células dañadas, por lo que reemplazan las células perdidas o dañadas.

El establecimiento de líneas de células de Müller iniciales en las condiciones de cultivo definidas puede ser dependiente del tiempo y es preferible cultivar las células de Müller aisladas durante al menos 2 o 3 semanas después de añadir el factor de crecimiento. Se forman colonias de células en el medio de cultivo y éstas se pueden

aislar y colocar en medio de cultivo nuevo para generar una gran cantidad de células.

Las células de Müller desdiferenciadas y cultivadas se dice que son inmortales por mantenerse y expandirse en cultivo durante muchos pases, y conservan la capacidad de diferenciarse en diferentes fenotipos en respuesta a los agentes de diferenciación.

- 5 Las células que se pueden obtener mediante el procedimiento de la invención se pueden utilizar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección asociada a la pérdida de células o al daño de las células, preferiblemente en un ojo humano. Las afecciones que se pueden tratar mediante el trasplante de las células de la invención incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, el agujero macular, la retinopatía diabética no proliferativa, la retinopatía diabética proliferativa, la vitreorretinopatía proliferativa, el desprendimiento de retina, la retinitis pigmentaria, el glaucoma, y la lesión y degeneración del nervio óptico.

Las células utilizadas para el tratamiento de los humanos deben proceder preferiblemente de células humanas para reducir los problemas con el rechazo inmunitario. Las células pueden ser células autólogas (procedentes del ojo de mamífero a tratar), células heterólogas almacenadas en un banco de células, o líneas de células modificadas genéticamente procedentes de estas células.

- 15 Para tratar un paciente suele ayudar el conocimiento de dónde se ha producido el daño en el ojo. Una vez que se ha establecido la existencia del daño, tanto si es un área aislada o está en varias áreas, se puede llevar a cabo el tratamiento mediante la implantación de células en el área dañada. Las células se pueden trasplantar en un único sitio, o preferiblemente en varios sitios.

- 20 Después del tratamiento se puede seguir el progreso del paciente con pruebas que se sabe que examinan la función visual cortical. Las técnicas de seguimiento adecuadas incluyen: 1) pruebas psicofísicas tales como el campo visual y las pruebas de sensibilidad de contraste, 2) pruebas electrofisiológicas, tales como el electroretinograma (ERG), y 3) técnicas de imagen de alta resolución, tales como la tomografía de coherencia ocular (TCO).

- 25 Preferiblemente, el tratamiento corregirá sustancialmente un deterioro visual. Sin embargo, el tratamiento de acuerdo con la presente invención, y con las células, medicamentos y preparaciones farmacéuticas de la invención, puede conducir a la mejoría de la función visual sin una corrección completa. Tal mejoría será digna de consideración y valiosa.

- 30 El número de células a utilizar variará según la naturaleza y la extensión del daño. Típicamente, el número de células utilizadas para el trasplante estará en el intervalo de unas 100.000 a varios millones. El tratamiento no tiene por qué restringirse a un único trasplante. Se pueden llevar a cabo otros trasplantes para mejorar la función visual todavía más. Las células que se pueden obtener por el procedimiento de la invención se pueden formular con cualquier diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y puede incluir otros agentes farmacéuticos más, entre ellos inmunosupresores o factores de crecimiento. Las células también pueden estar genéticamente modificadas para que expresen otros fármacos que se pueden requerir en el sitio del daño.

- 35 Las células también se pueden combinar con agentes que se sabe que dan plasticidad al sistema nervioso, los cuales pueden realzar la capacidad que tienen las células para conectarse con el sistema nervioso y crecer en el ojo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

- 40 Desdiferenciación de células progenitoras de Müller adultas en células que expresan marcadores de las neuronas retinianas.

- 45 Se cultivaron células de Müller en suspensión en placas de cultivo revestidas con matrigel a una densidad de 1000 células/ml en el medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% (SBF) y FGF-2 (40 µg/ml) solo o bien en combinación con insulina (100 µg/ml), 2) ácido retinoico (AR) (500 nM) o 3) triyodotironina (T3, 40 µg/ml). Al cabo de 3 a 10 días de cultivo en el que cada 48 horas se reemplazaba el medio por uno nuevo, las células mostraron distintos cambios de aspecto y de expresión de marcadores neurales retinianos. Por ejemplo, al cabo de 5 días de cultivo en Matrigel y en presencia de FGF2, las células formaron neuroesferas y las células contenidas en las neuroesferas se fijaron a PNA y expresaron nestina, calretinina y tubulina βIII (marcadores de las células progenitoras neurales). Cuando se cultivan con fibronectina en presencia de ácido retinoico, las células de Müller formaron neuroesferas y también mostraron un aspecto neural. También expresaban la nestina y los marcadores de las neuronas retinianas, que incluyen la proteína de neurofilamentos de 68 kDa, la Thy-1 y la calretinina, así como la rodopsina, un marcador de los bastones fotorreceptores. Al cabo de 10 días de cultivo en Matrigel en presencia de

FGF2 e IGF-1, mostraban una forma neural y expresaban los marcadores neurales retinianos Thy-1, enolasa específica de las neuronas y la calbindina. Además, expresaban la rodopsina y la periferina, que son moléculas marcadoras de las células fotorreceptoras.

Ejemplo 2

5 Restauración de la función visual en modelos experimentales de degeneración de la retina

Las ratas del *Royal College of Surgeons* (RCS) distróficas de tres semanas de edad, que muestran degeneración progresiva de los fotorreceptores acompañada de pérdida de células ganglionares, se inmunodeprimieron con ciclosporina A y se les inyectó por vía transescleroide en el espacio subretiniano dorsotemporal 2 µl del medio DMEM que contenía 10⁵ células de Müller. La arquitectura y localización de las células trasplantadas en la retina se examinó a las 8, 12 y 15 semanas del trasplante mediante técnicas histopatológicas e inmunohistoquímicas. Se midió la función visual cronometrando el movimiento de cabeza de los animales en un intervalo establecido, cuando se colocaban en una plataforma estacionaria en el centro de un cilindro rotatorio rayado con tiras negras y blancas. Mediante este protocolo experimental, si la rata puede ver, las líneas en movimiento provocan una respuesta optocinética involuntaria tal como que la rata siga la pista del movimiento. Los resultados mostraban que las células madre de Müller humanas trasplantadas en el espacio subretiniano de las ratas RCS migraron a través de la retina y se localizaron en las capas de las células ganglionares y fotorreceptoras.

La evaluación de la forma de la retina en las ratas trasplantadas mostraba que la capa de las células fotorreceptoras y el aspecto general de la retina estaban bien conservados (véase la figura 6). También mostraron que las células madre de Müller trasplantadas conservaron la función visual en las ratas RCS, a juzgar por las respuestas de seguimiento de la cabeza.

Ejemplo 3

Pluripotencialidad de las células madre de Müller *in vitro*

De forma similar a lo observado con las células progenitoras neurales de la retina de rata, ratón y pollo, una gran proporción de células presentes en las células desdiferenciadas expresaron 1) ciclina D, una proteína del ciclo celular implicada en la regulación de la proliferación durante el desarrollo de la retina; 2) fijación a la aglutinina de cacahuete, una lectina que se fija a los glucoconjugados de las células madre neurales pluripotentes; 3) calretinina, un marcador neural importante de la reina; 4) nestina y tubulina βIII, los primeros marcadores de la diferenciación neural; y 5) marcadores de las células progenitoras neurales de la reina, entre ellas Six 3/6 y Sox-2. Estas células parecían dar origen a diferentes neuronas maduras en la reina, tal y como se muestra por la heterogeneidad de los marcadores neurales de la retina que expresan. Estos incluían Thy-1, NSE, Brn 5,0, HuD, periferina, calretinina y rodopsina.

Al cabo de 5 a 7 días, las células mostraban rasgos morfológicos y marcadores de neuronas retinianas diferenciadas. Sin embargo, de acuerdo con la matriz extracelular y los factores de crecimiento utilizados para la desdiferenciación, había variabilidad en la proporción de células que expresaban diferentes marcadores, así como en el perfil de expresión de estas moléculas. Esto queda ilustrado mediante las observaciones de que la tinción de Pax-6 era principalmente citoplasmática en las células cultivadas en BMP únicamente o en FN con FGF-2, pero que predominaba la tinción nuclear para este factor en las células cultivadas en la BMP con FGF-2 o con AR. Se observó la tinción citoplasmática de Six 3/6 en las células cultivadas en FN o BMP en presencia de FGF-2, mientras que se observaba la tinción nuclear de este factor en las células cultivadas en la proteína de la matriz basal (BMP, por su nombre en inglés) con ácido retinoico (AR). La tinción de Sox-2 estaba asociada característicamente a las extensiones citoplasmáticas y de las neuritas y las células cultivadas en FN o BMP con FGF-2 mostraban una forma bipolar característica y expresaban la periferina, con lo que se parecían a las células fotorreceptoras. Se observaron extensiones de neuritas de hasta 250 µm de largo cuando se tiñeron las células para esta molécula. La expresión de PKC y de Chx10 era predominantemente citoplasmática, mientras que la expresión de la proteína *sonic hedgehog* (Shh) era característicamente densa alrededor de los núcleos. Sin embargo, la asociación nuclear de este factor predominaba en las células cultivadas en BMP con AR.

Además de estas diferencias, la exposición a diferentes condiciones de cultivo dio lugar a la variabilidad de la proporción de las células que expresaban marcadores individuales. Cuando se cultivaron en BMP con AR, del 17 al 19 % de las células expresaron Pax-6, en comparación con el 82 % de las células cultivadas en fibronectina en presencia de FGF-2. Una gran proporción de células (71 %) mantenía la expresión de CRALBP cuando se sembraron en FN con FGF-2, a diferencia de <18 % cultivadas en presencia de BMP y AR o FGF-2. Sox-2 se expresaba en el 50 al 88 % de las células madre de Müller desdiferenciadas independientemente del sustrato y del factor de crecimiento utilizado, mientras que una gran proporción (85 %) de células expresaban HuD cuando se cultivaron en FN en presencia de FGF-2. Un número relativamente grande de células que expresaban periferina (22-29 %), Shh (39-40 %), Chx10 (15-21 %) y PKC (29-33 %) se observó también cuando las células se cultivaron en

presencia de FGF-2.

Ejemplo 4

Expresión *in situ* de los marcadores de célula progenitora en las células de Müller de la retina humana adulta.

5 Los resultados de que las células madre pluripotentes aisladas de la retina neural adulta constituyen una población de células de Müller sólo se podrían confirmar si estas células se conseguían identificar *in situ*. Por lo tanto, los cortes de retina se cotiñeron con anticuerpos contra diferentes marcadores de célula progenitora de la reina y los marcadores de las células de Müller CRALBP o nestina. La microscopía confocal mostraba que una población de células localizadas en la retina central neural, con el aspecto característico de las células de Müller y que expresaban CRALBP, expresaban los marcadores de célula progenitora Shh, Sox-2 y Chx10. Aunque la frecuencia de las células de Müller que coexpresaban estos marcadores es más alta en la retina periférica (del 2 al 5 % del número total de células de la capa nuclear interior (CNI)) que de la retina central (del 1 al 2 % de las células de la CNI), las células se observaban con claridad a una distancia de 2,0 a 2,5 cm del cuerpo ciliar. La cotinción de la nestina en los cortes de la retina también identificó células de Müller que coexpresaban este marcador de célula progenitora y los factores de transcripción Shh, Sox-2 y Chx10. En los cuatro especímenes evaluados se observaba la cotinción de las células de Müller con los marcadores de célula progenitora. Estas observaciones respaldan con rotundidad las observaciones de que una población de células de Müller de la retina neural humana adulta tiene características pluripotentes y que se pueden aislar con facilidad y se pueden mantener indefinidamente *in vitro*.

Ejemplo 5

Destino de las células progenitoras de Müller tras el injerto en el espacio subretiniano de la rata RCS.

20 Al usar anticuerpos contra las mitocondrias humanas para rastrear las células madre de Müller injertadas se observó que, de 7 a 9 días después de la inyección subretiniana, las células se agrupaban en pequeñas aglomeraciones a lo largo de la superficie de la capa nuclear externa (CNE), y que algunas células habían migrado a las capas de las células retinianas (figura 7A). Las células que habían migrado a la capa de las células fotorreceptoras expresaban la rodopsina, un marcador específico de los bastones (figura 7B), mientras que las células que habían migrado a la capa de las células ganglionares (CCG) expresaban la calretinina (figura 7B), un marcador de células ganglionares. Se observaba un perfil similar de migración y localización de las células trasplantadas a las 5 semanas del trasplante.

Ejemplo 6

El injerto de células madre de Müller conserva la integridad retiniana y la función visual en las ratas RCS distróficas.

30 El análisis del aspecto de la retina al cabo de 15 semanas del injerto de las células madre de Müller mostraba una buena conservación de la integridad de la retina, a juzgar por la organización anatómica de las células fotorreceptoras en la CNE y una forma normal de los segmentos externos. Se observó el grosor completo de la CNE en uno de los animales y se contrastó con una poca presencia de células fotorreceptoras en la retina contralateral sin trasplantar (figura 6).

35 La función visual, según se determinó con los experimentos de seguimiento de la cabeza, mostró que las ratas trasplantadas con las células madre de Müller eran capaces de seguir todos los estímulos de rayado significativamente mejor que los animales con operación quirúrgica simulada. Esta capacidad para responder a los estímulos visuales era mucho mayor a las 12 y 15 semanas que 8 semanas después del trasplante (figura 8). A las 8 semanas, los animales trasplantados no mostraban diferencias con las ratas con operaciones simuladas en el seguimiento de un estímulo visual de 0,125 ciclos por grado, pero en rayados de 0,25 y 0,5 ciclos por grado, los animales trasplantados siguieron significativamente mejor con la cabeza que las ratas con operación simulada. Al cabo de 15 semanas se observó una disminución de la respuesta visual a todos los estímulos de rayado en los animales trasplantados, aunque esta respuesta era significativamente más altas que en las ratas con operación quirúrgica simulada.

45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de células de la reina, útiles para el tratamiento de trasplante, que comprende las etapas de:
 - 5 (i) haber obtenido *in vitro* una o varias células de Müller adultas de humano que expresan la proteína de fijación al retinaldehído celular y la vimentina; y
 - (ii) cultivar las células en presencia de una proteína de la matriz extracelular seleccionada entre matrigel, fibronectina, colágeno, vitronectina y laminina, y un factor de crecimiento seleccionado entre EGF o FGF-2 para desdiferenciar las células en células que expresan al menos uno de los marcadores de célula progenitora seleccionados entre nestina, proteína *sonic hedgehog*, tubulina β III, Shh, Sox-2 y Chx10, mediante lo cual las células de Müller se vuelven inmortales.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína de la matriz extracelular es la fibronectina y el factor de crecimiento es el EGF.
3. Procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde las células desdiferenciadas se cultivan adicionalmente en presencia de una proteína de la matriz extracelular seleccionada entre matrigel, fibronectina, colágeno o laminina, y los agentes de diferenciación se seleccionan entre FGF-2, ácido retinoico, 3,3',5-triyodo-L-tironina, insulina, factor de crecimiento de tipo insulina o TGF β , para así inducir a las células desdiferenciadas a que adopten un fenotipo de célula neural diferenciada y específica.
- 15 4. Utilización de una célula retiniana humana que se puede obtener mediante un procedimiento como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección asociada a la pérdida de las células o al daño celular, en donde el procedimiento comprende las etapas de:
 - 20 (i) haber obtenido *in vitro* una o más células de Müller adultas de humano que expresan la proteína de fijación al retinaldehído celular y la vimentina; y
 - (ii) cultivar las células en presencia de una proteína de la matriz extracelular seleccionada entre matrigel, fibronectina, colágeno, vitronectina y laminina, y un factor de crecimiento seleccionado entre EGF o FGF-2 para desdiferenciar las células en células que expresan al menos uno de los marcadores de célula progenitora seleccionados entre nestina, proteína *sonic hedgehog*, tubulina β III, Shh, Sox-2 y Chx10, mediante lo cual las células de Müller se vuelven inmortales.
- 25 5. Utilización de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula retiniana es una célula madre pluripotente de Müller.
- 30 6. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en donde la afección está asociada a pérdida de células o al daño en un ojo humano.
7. Utilización de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6, en donde la afección a tratar se selecciona del grupo que consiste en: degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética proliferativa, vitreorretinopatía proliferativa, desprendimiento de retina, retinitis pigmentaria, glaucoma y lesión del nervio óptico y degeneración.
- 35 8. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde las células son células autólogas, procedentes del paciente a tratar, células heterólogas almacenadas en un banco de células o células modificadas genéticamente procedentes del paciente o de un banco de células.

40



A



B



C

Figura 1

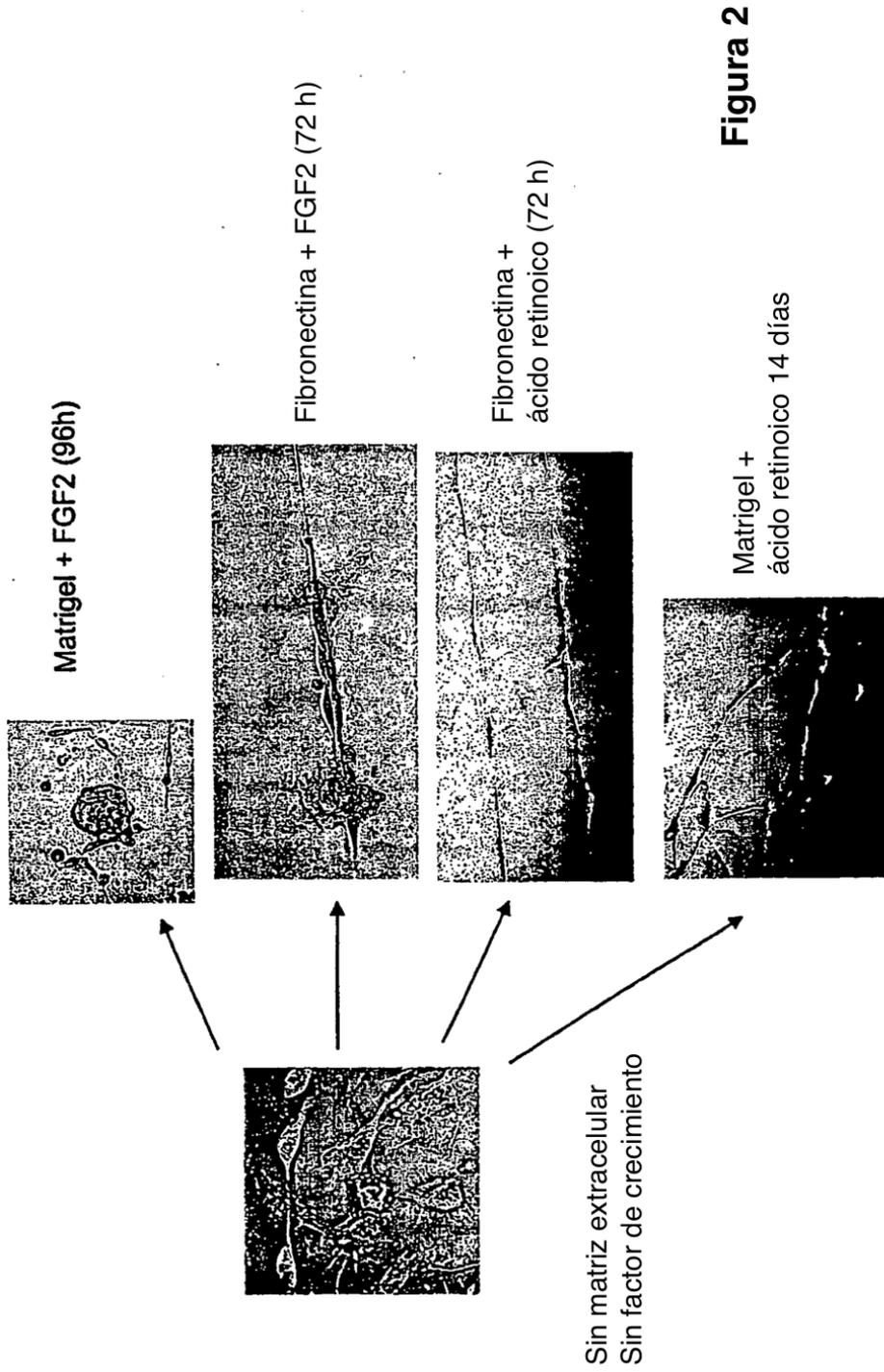
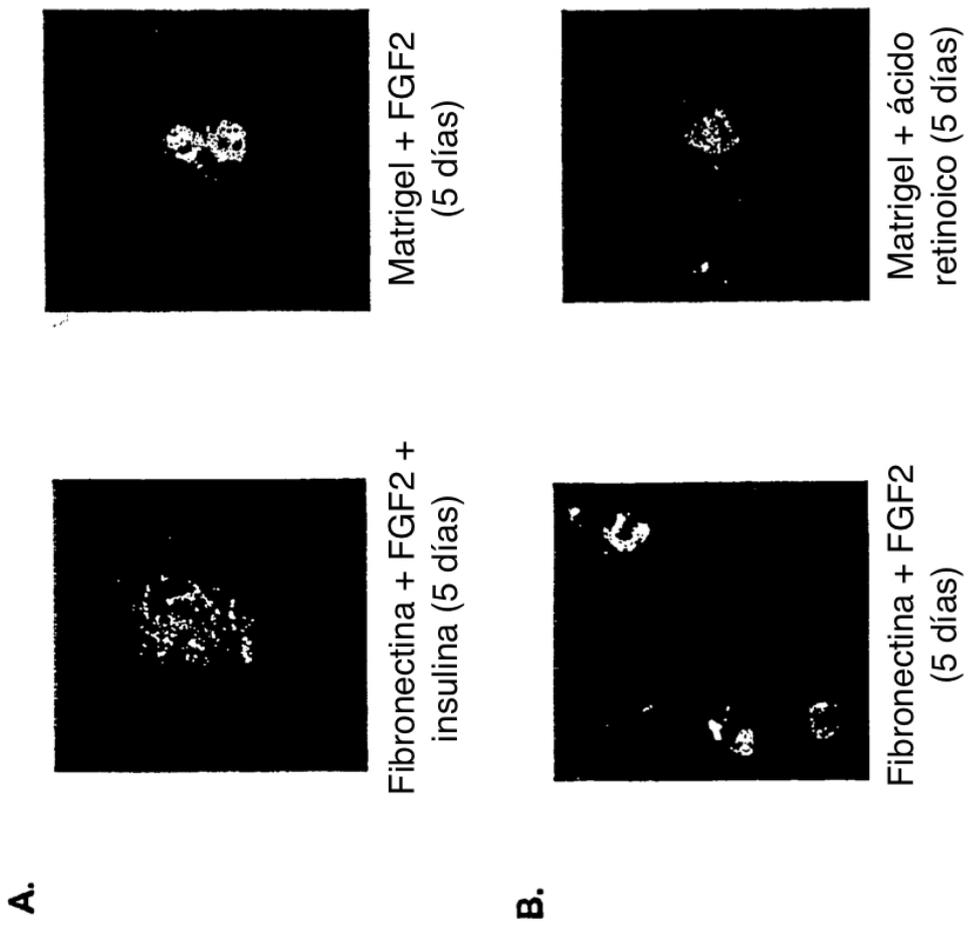


Figura 3



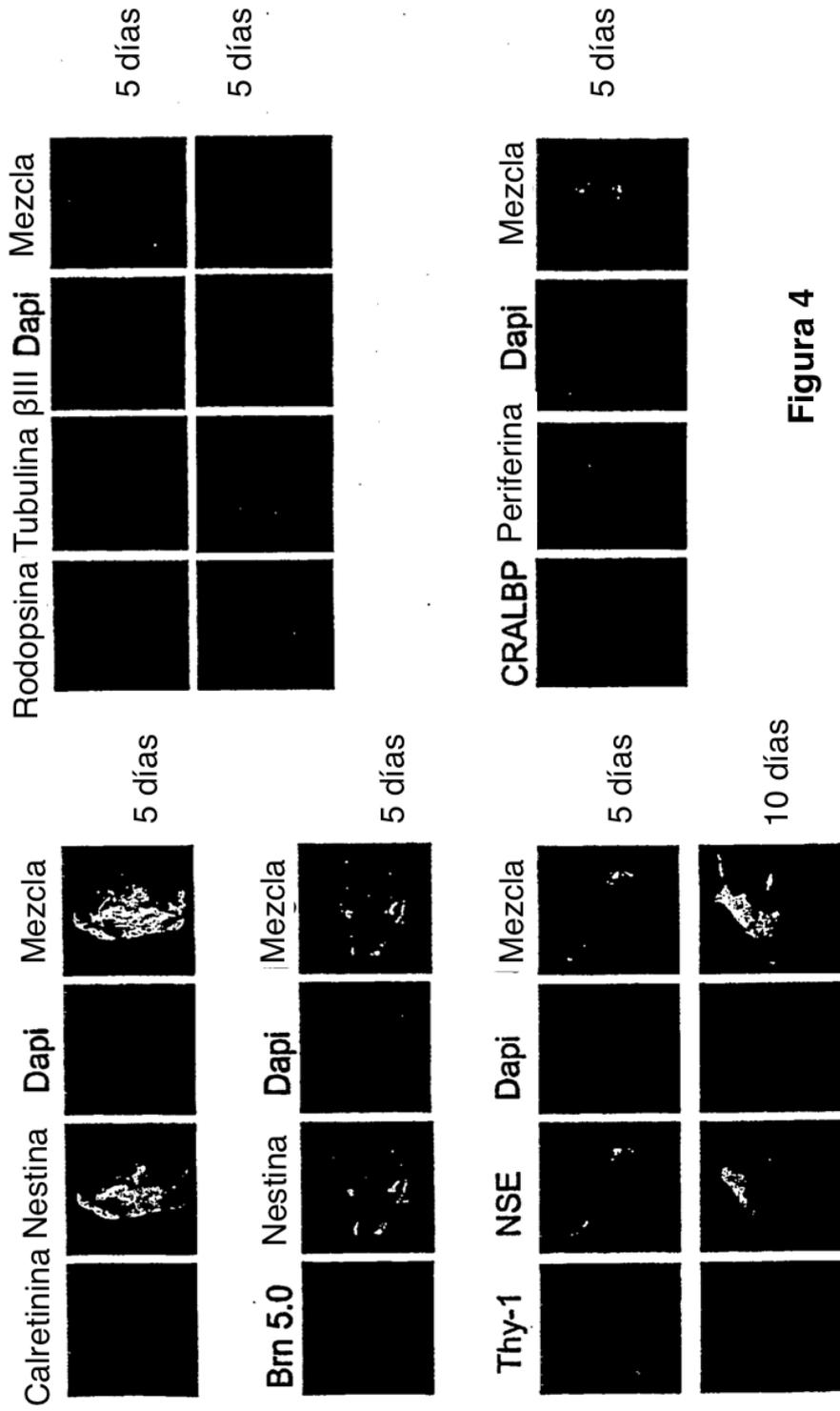


Figura 4

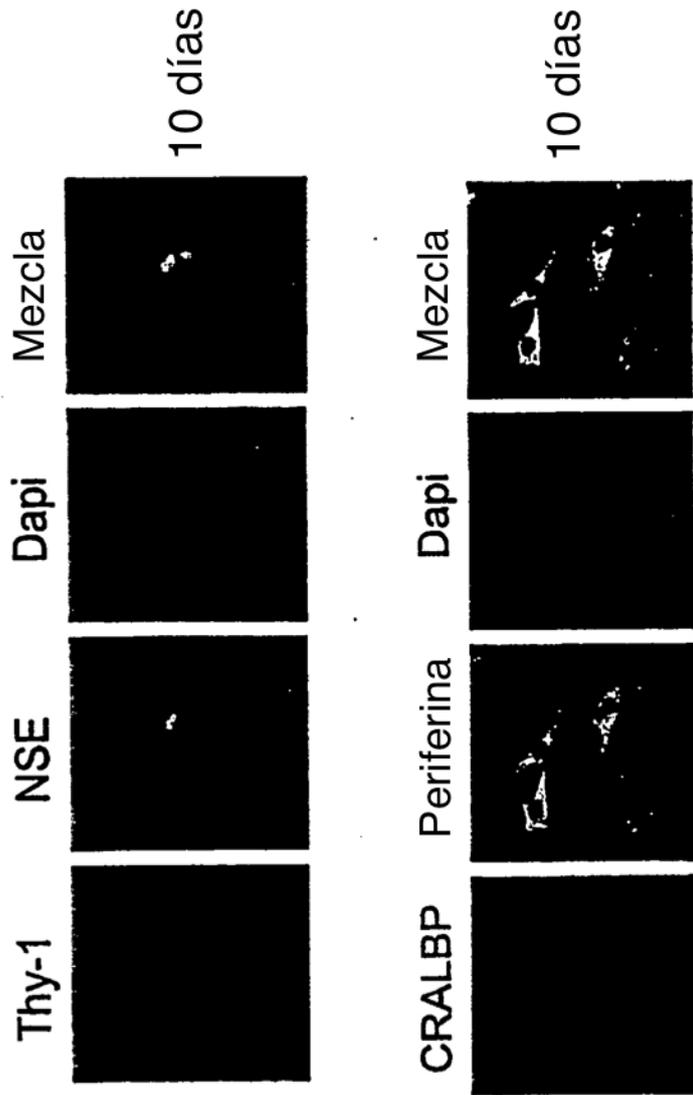
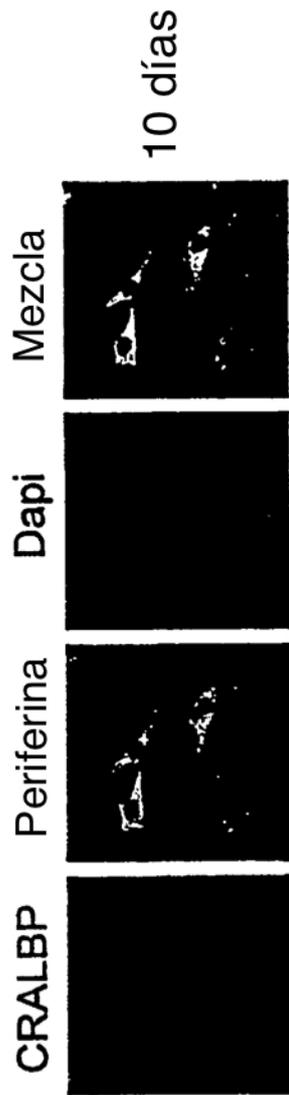
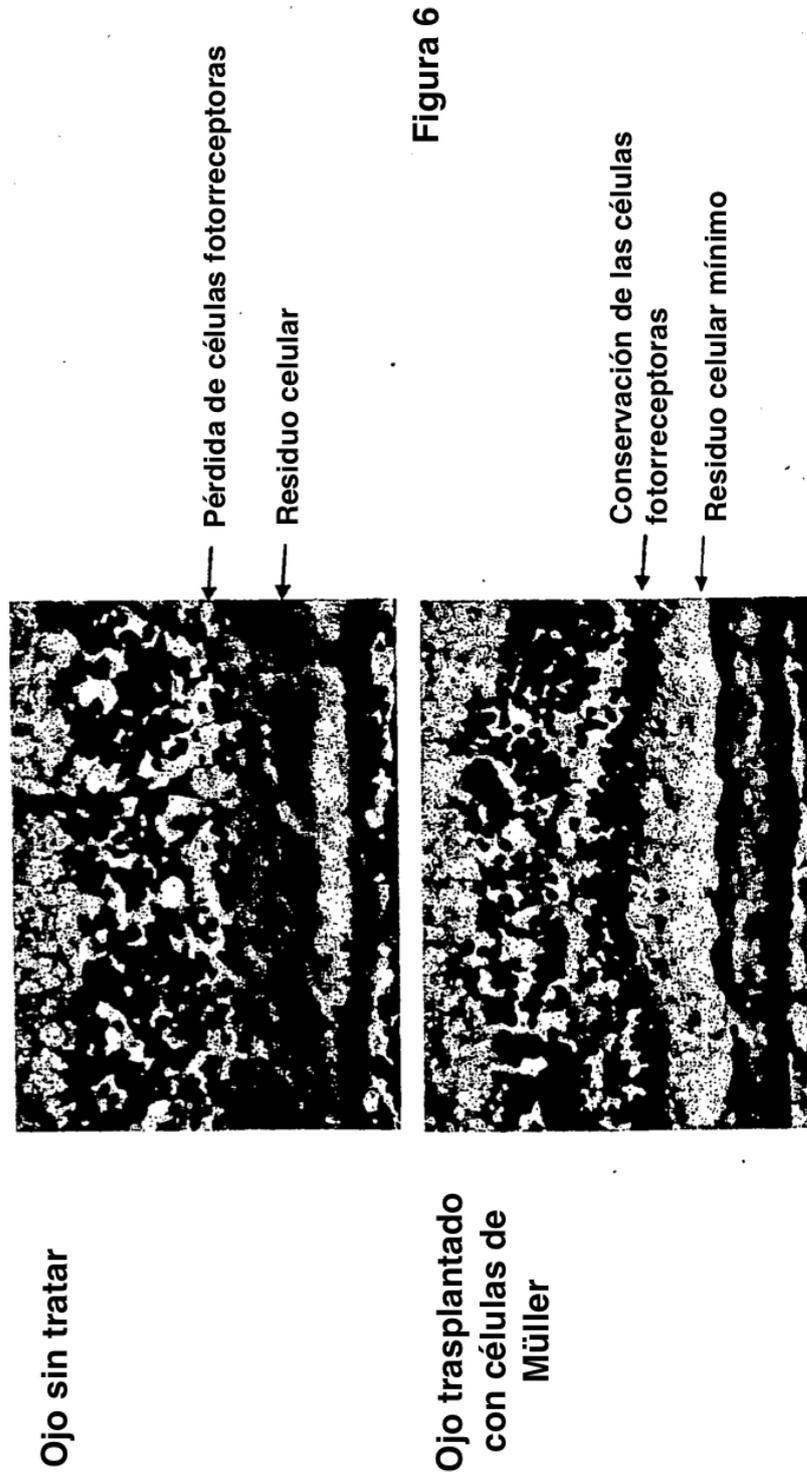


Figura 5





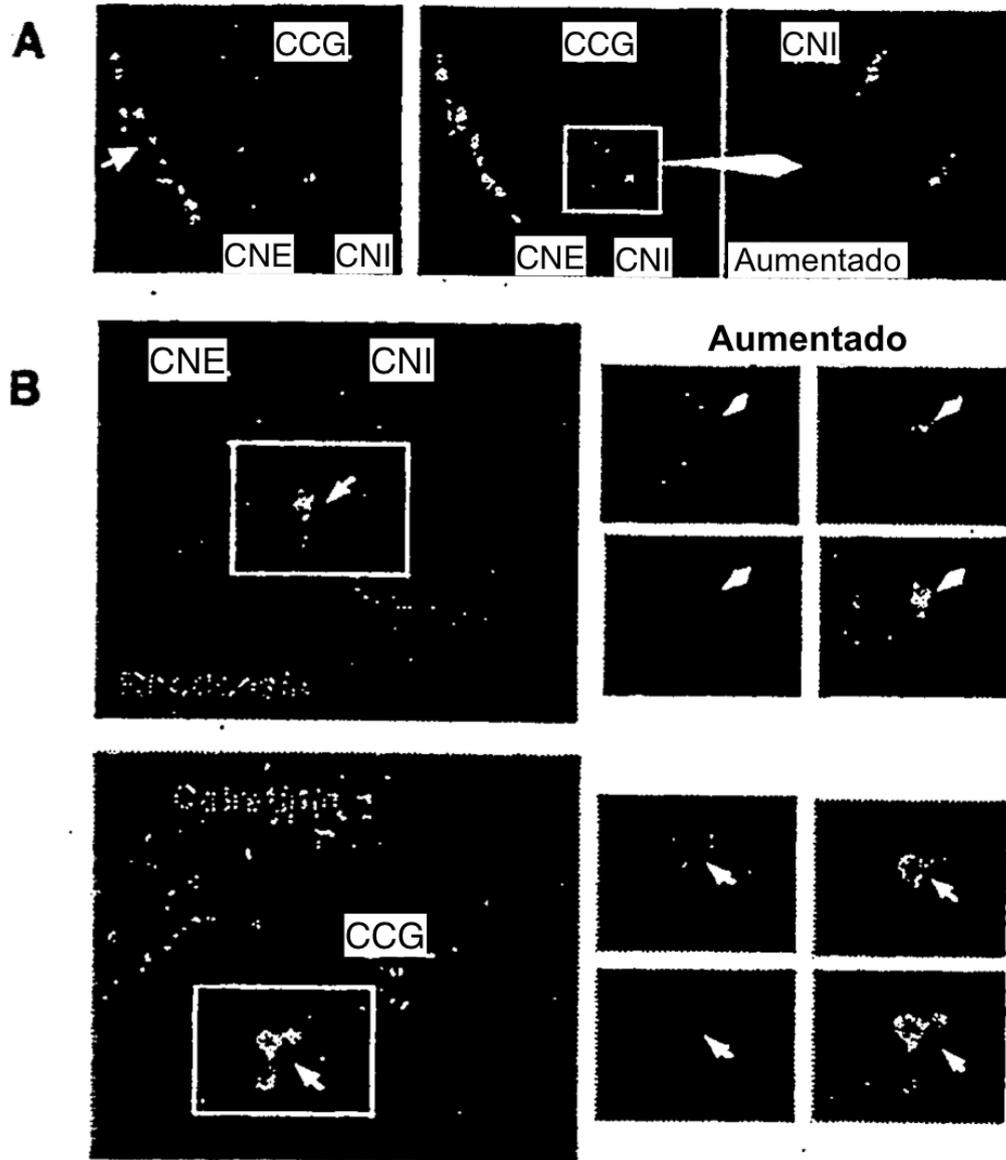


Figura 7

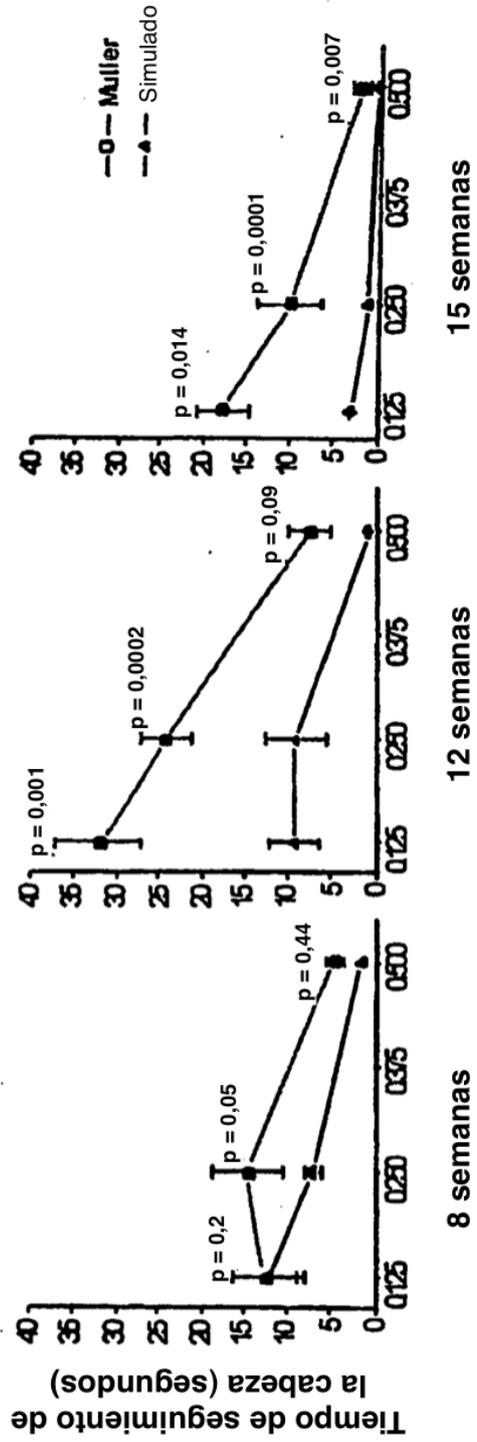


Figura 8